

ROSEMARY VIOLA BOSCH

Fatores hepatotróficos modulam a capacidade proliferativa em cultura primária de hepatócitos de ratos normais

São Paulo

2010

ROSEMARY VIOLA BOSCH

Fatores hepatotróficos modulam a capacidade proliferativa em cultura primária de hepatócitos de ratos normais

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior

São Paulo
2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2248
FMVZ

Bosch, Rosemary Viola

Fatores hepatotróficos modulam a capacidade proliferativa em cultura primária de hepatócitos de ratos normais /Rosemary Viola Bosch. -- 2010.

214 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior.

1. Hepatócito. 2. Fatores hepatotróficos. 3. Apoptose. 4. Citoqueratina.
5. Lipoperoxidação. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

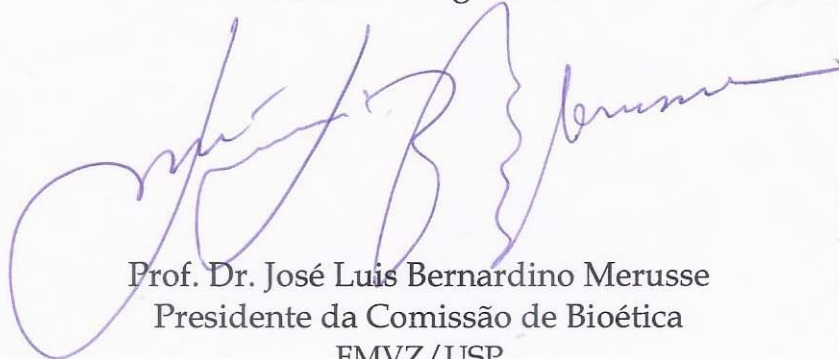
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação *in vitro*" de fatores hepatotróficos em hepatócitos e células estreladas isoladas de ratos normais", protocolado sob o nº 1160/2007, utilizando 10 (dez) ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/08/07.

We certify that the Research "*in vitro*" effects of hepatotrophic factors solution on normal rat liver", protocol number 1160/2007, utilizing (ten) rats, under the responsibility Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 08/22/2007.

São Paulo, 22 de agosto de 2007



Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BOSCH, Rosemary Viola

Título: Fatores hepatotróficos modulam a capacidade proliferativa em cultura primária de hepatócitos de ratos normais

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Assinatura: _____

Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Assinatura: _____

Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Assinatura: _____

Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Assinatura: _____

Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Assinatura: _____

Instituição: _____
Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu amor, companheiro incondicional, **Valter Bosch**. Estar com você me torna uma pessoa melhor a cada dia. Eu te amo cada vez mais! Obrigado do fundo do meu coração!

Aos meus filhos **Gabriel Viola Bosch e Marcela Viola Bosch**. Meu tesouro, minha vida! Vocês são o melhor de mim!

Ao meu pai, **José Viola**, *in memoriam*, exemplo de dignidade, honra, dedicação, onde quer que esteja. Tenho certeza que guiou os meus passos nos momentos difíceis. É um orgulho ser sua filha!

À minha mãe **Marianna Nassar Viola**, minha fortaleza, meu porto seguro. Suas palavras e orações sempre foram um bálsamo prá minhas angústias. Amooooo.....demais!

Aos meus irmãos **Cezar Augusto Viola e Julio Cezar Viola**, meus incentivadores. Somos os irmãos **VIOLA!**

Aos meus sobrinhos **Cezar Augusto Salgueiro Viola, Leandro Salgueiro Viola, Guilherme Nassar Viola e Cláudia Nassar Viola**.

Às minhas cunhadas **Ligia de Castro Salgueiro Viola e Marcia Maria da Silva Viola**.

Aos meus tios **Marlene Nassar Berringer e Celso Berringer** *in memoriam* por minha criação e por participarem de todos os momentos importantes de minha vida. Nunca vou esquecê-los!

À minha prima **Rosalind Mobaid** em quem me espelho desde pequena. Sou sua fã!

Ao meu padrinho **Olympio Geraldo Gomes**, exemplo de ética, profissionalismo e dedicação. Conviver com você é um privilégio prá mim.

Aos animais de experimentação meu respeito e reconhecimento!

AGRADECIMENTOS

À **Universidade de São Paulo**, berço de minha formação, que me acolheu e tornou possível a realização de um sonho.

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, minha casa.

Ao meu orientador **Prof Dr. José Roberto Kfoury Junior**, pela oportunidade, confiança e respeito a mim dedicados e por permitir que eu desenvolvesse este trabalho.

Ao Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria, pela disposição, empenho, entusiasmo e amor à pesquisa. Sua vida acadêmica é um exemplo a ser seguido. Seus ensinamentos me acompanharão por toda minha vida. Saiba que o Sr. tem em mim uma leal colaboradora e amiga incondicionalmente. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez-Blaquez, que honra esta casa com seus ensinamentos e que não poupou esforços para que eu concluísse este trabalho.

A Prof^a. Dra. Maria Angélica Miglino, coordenadora deste programa, que faz dele um dos melhores do país!

Ao Prof. Dr. Ricardo Coutinho do Amaral, responsável pelo meu retorno à vida acadêmica, minha eterna lealdade e amizade!

A todos os professores do Departamento de Cirurgia - Setor de Anatomia desta faculdade.

À minha amiga **Janaína Munuera Monteiro** minha parceira de todos os tempos. Obrigada pela dedicação, empenho, colaboração, companheirismo e amizade. Você mora no meu coração!

Ao Laboratório de Biofísica e Bioquímica do Instituto Butantan, coordenado pelo **Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria**, no qual desenvolvi grande parte desta pesquisa, sempre sob os olhares vigilantes do Professor Durvanei.

À equipe do Laboratório de Biofísica e Bioquímica do Instituto Butantan, coordenado pelo Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria: **Norma Estefania Andrades Ikeda, Adilson Kleber Ferreira, Fernanda Faião-Flores, Vanessa Martins, Ricardo Augusto Azevedo, Rodrigo Oliveira Silveira e Adriana Terra**, que me acolheram e tornaram minha jornada muito leve. Conviver com vocês é estar em casa! Obrigada!

Aos meus amigos **Bruno Cogliati e Thiago Pinheiro A. Aloia**. Obrigada pelo carinho e ajuda. Nunca vou esquecê-los!

À **Profa. Dra. Maristela Camargo** pela disposição em ensinar e ajudar sempre.

À **Profª Drª. Maria Lúcia Zaidan Dagli e Bruno Cogliati**-Laboratório de Oncologia Experimental e Cultura de Células-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP

Aos meus amigos **Lílian de Jesus Oliveira, Ana Rita de Lima, Thaís Chucri Zaidan, Renata Stecca Iunes, Juliana Placido Guimarães, Renata de Britto Mari e Fernanda Rodrigues Agreste** pelo incentivo e estímulo para a execução deste trabalho. Este trabalho é fruto da colaboração de cada um de vocês!

A todos os **colegas do programa de pós-graduação** da Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, pela alegria da convivência durante a execução deste trabalho.

Aos funcionários e amigos do setor de anatomia **Edinaldo Ribas Farias (Índio), Diogo Palermo, Raimundo Leal de Sousa, João do Carmo Freitas e Ronaldo Agostinho da Silva** pela ajuda, amizade e ensinamentos.

Aos meus amigos da secretaria do setor de Anatomia, **Jaqueline Martins de Santana e Maicon Barbosa da Silva**.

Às funcionárias da secretaria da **PÓS-GRADUAÇÃO, BIBLIOTECA E COMISSÃO DE BIOÉTICA**, pela colaboração para a confecção desta tese.

À minha irmã de coração e amiga **Rosália Regina De Lucca** pelo incentivo para que eu concluísse esse trabalho.

À MV Cláudia Mori, responsável técnica do **Biotério da FMVZ/USP**, a quem agradeço a ajuda incontestante.

A todos os **funcionários do Biotério da FMVZ/USP**, que com sua dedicação em cuidar dos animais de experimentação contribuíram para a realização desta tese.

Às minhas secretárias **Iraídes Almeida da Silva** e **Jeane Ribeiro dos Santos Silva** que estiveram sempre a meu lado e facilitaram minha trajetória.

À **Fórmula Medicinal Suporte Nutricional e Manipulação Ltda**, na pessoa do farmacêutico **Valmir Machado da Silva** proprietário e responsável técnico e da farmacêutica **Janaína do Amaral Bueno** que manipulava os fatores hepatotróficos utilizados nesta pesquisa.

Ao Dr. **Osório Miguel Parra, MD**, idealizador da solução de fatores hepatotróficos.

A todos que, de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigada!

HOMENAGEM

Ao Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria, exemplo de profissional, orientador e amigo, pela alma generosa e por compartilhar com ele, momentos ímpares de aprendizado!!! Ser sua aluna é um privilégio!!!!!!

"Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante"

Albert Schweitzer (Nobel da Paz - 1952).

RESUMO

BOSCH, R. V. **Fatores hepatotróficos modulam a capacidade proliferativa em cultura primária de hepatócitos de ratos normais.** [Hepatotrophic factors modulate the proliferative potential in primary hepatocyte cultures of normal rats]. 2010. 214 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A utilização de fatores hepatotróficos (FH) tem trazido importantes avanços no tratamento de algumas doenças hepáticas. A avaliação dos efeitos dessas substâncias pode ser feita com o uso de modelos *in vivo*, como a regeneração hepática após a hepatectomia parcial ou *in vitro*, como a cultura de hepatócitos, células estreladas ou outros tipos celulares do fígado. O modelo de cultura demonstra ser útil por possibilitar a análise individualizada de determinadas substâncias ou soluções diretamente nas células-alvo, facilitando o delineamento de seu mecanismo de ação. Dessa forma, o presente trabalho estudou *in vitro* os efeitos da administração de fatores hepatotróficos (FH) em hepatócitos isolados de fígados de ratos, avaliando seu metabolismo e proliferação celular. Trinta ratos Wistar fêmeas foram utilizados, o fígado retirado e, por digestão enzimática *in situ*, suas células foram dissociadas e os hepatócitos separados em gradiente de Percoll 45%; cultivados em meio DMEM/F12, tratadas com diferentes concentrações dos FH (1X, 5X e 10X) e analisadas em intervalos de 24, 48 e 72 horas. A viabilidade e a proliferação celular foram avaliadas pelo método colorimétrico MTT, a toxicidade pelo iodeto de propídeo, o potencial elétrico da membrana mitocondrial pela Rodamina 123 e a expressão da citoqueratina 8, 18 e desmina como marcadores do citoesqueleto. O metabolismo hepático foi avaliado pela depuração do verde de indocianina (VIC), pela quantificação de colágeno tipo I e pela formação de radicais lipídicos poliinsaturados peroxidados. A técnica utilizada para a obtenção de hepatócitos mostrou-se eficaz com viabilidade superior a 90%, sem apresentar toxicidade, com manutenção do potencial mitocondrial e com marcação positiva para citoqueratinas 8, 18 e desmina. A adição dos FH aumentou a proliferação dos hepatócitos nos três períodos analisados em relação ao grupo controle. Os FH não demonstraram toxicidade em cultura primária de hepatócitos em nenhuma das concentrações avaliadas ao longo de todos os períodos experimentais. A adição dos

FH na concentração de 10X evitou a formação de radicais livres, protegendo os hepatócitos da lipoperoxidação. Por outro lado, a avaliação funcional das culturas primárias pelo teste VIC mostrou-se eficaz na determinação do metabolismo dos hepatócitos, como a manutenção dos níveis das transaminases e amilase. Os hepatócitos mantidos em cultura primária após a adição dos FH em todos os períodos analisados aumentaram a produção de colágeno, e também foram capazes de modificar a distribuição da população de células nas fases quiescentes, aumentando sua capacidade de síntese. A adição dos FH nas concentrações estudadas nas culturas de hepatócitos mostrou-se eficaz na manutenção dessas células, mantendo-se funcionalmente ativos, com a expressão dos marcadores de seu metabolismo e diferenciação.

Palavras-chave: Hepatócito. Fatores hepatotróficos. Apoptose. Citoqueratina. Lipoperoxidação.

ABSTRACT

BOSCH, R. V. **Hepatotropic factors modulate the proliferative potential in primary hepatocyte cultures of normal rats.** [Fatores hepatotróficos modulam a capacidade proliferativa em cultura primária de hepatócitos de ratos normais]. 2010. 214 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The use of hepatotropic factors (HF) has provided important advances in the treatment of several hepatic disorders. The evaluation of this treatment may be carried out by *in vivo* models, as experiments on hepatic regeneration after partial hepatectomy; or *in vitro* models as culture of hepatocytes, stellate cells or any other hepatic cell. This last model allows an individual analysis of the studied substances on their target cells, providing the possibility of further investigation on the mechanisms involved. Therefore, the present study evaluated the *in vitro* effects of the hepatotropic factors administration on the metabolism and proliferation of cultured hepatocytes from normal rat liver. Liver from 30 Wistar rats were used, and after *in situ* enzymatic dissociation, hepatocytes were collected and separated by 45% Percoll density gradient, cultivated in DMEN/F12 media supplemented with different HF concentrations (1×, 5× and 10×) and finally analyzed at 24, 48 and 72hs intervals. Cell viability and proliferation were assessed by MTT colorimetric assay, cell toxicity by propidium iodide, mitochondrial membrane electrical potential by 123 rodamine test and cytokeratin 8, 18 and desmin as cytoskeleton markers. Hepatic metabolism was evaluated by infusion of *indocyanine* green (ICG), by type I collagen quantification and by peroxidized polyunsaturated lipid radicals production. The techniques used in order to collect hepatocytes proved to be efficient, with a viability higher than 90%, no toxicity, and the maintenance of the mitochondrial membrane potential and positive labeling for cytokeratins (CK) 8, 18 and desmin. The HF addition increased the proliferation of hepatocytes in the three periods analyzed, when compared to the control group. The HF did not show any toxicity in primary hepatocytes culture regardless of the concentration evaluated along the experimental periods. The HF addition impaired the production of free radicals, protecting the hepatocytes from the lipid peroxidation. On the other hand, the functional evaluation of primary hepatocytes cultures using the ICG test proved to be efficient in the

determination of the hepatocytes metabolism, as the maintenance of the transaminase and amylase levels. The hepatocytes kept in primary culture after HF addition in all the analyzed periods increased the collagen production and were also able to shift the distribution of quiescent cells population of, thus increasing their synthesis capacity. The HF addition in the studied concentrations in hepatocytes cultures proved to be efficient in the maintenance of these cells, that remain functionally active and expressing their metabolism and differentiation characteristic markers.

Keywords: Hepatocyte. Hepatotrophic Factors. Apoptosis. Cytokeratin. Lipid Peroxidation.

LISTA DE ABREVIATURAS

aFGF	fator de crescimento de fibroblastos ácido
AKT	via da proteína cinase B, responsável pela modulação de vias intracelulares relacionadas com a promoção do crescimento e da sobrevivência celular
ALT	alanina amino transferase
AR	anfirregulina, tb conhecido como fator de crescimento de schwanoma
AST	aspartato amino transferase
ATP	adenosina trifosfato
BSA	albumina sérica bovina
C	colesterol
C3	fração 3 do sistema complemento
C5	fração 5 do sistema complemento
CAR	receptor constitutivo de androstane
cdk2/D	ciclina dependente de quinase 2D
cdk4/E	ciclina dependente de quinase 4E
Cks.....	citoqueratinas
c-met	receptor de HGF
CNP	células não parenquimatosas
CO ₂	dióxido de carbono
COBEA	colégio brasileiro de experimentação animal
CsA	ciclosporina-A
DAB	diaminobenzidina
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 Ham
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP	desvio padrão
4E-BP1	repressor transducional
EGF	fator de crescimento epidérmico
EGFR	receptor de fator de crescimento epidérmico
EPR	epirregulina
ERK	quinase regulada por sinal extracelular
ERN	espécie reativa de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
FACS	citômetro de fluxo
FH	fatores hepatotróficos

FITC	isotiocianato de fluoresceína
FK506	tacrolimus
FoxM1b	fator de transcrição nuclear que regula a expressão da proteína p27 durante a fase S do ciclo celular
FSC	forward scatter channel
G	constante universal da gravitação
GAP	junções comunicantes
GGT	gamaglutamiltransferase
GH.....	hormônio de crescimento
GL	Gay Lussac
HB-EGF	fator de crescimento epidérmico ligado a heparina
HBSS	solução tampão de Hank's
HCL	ácido clorídrico
HDL	lipoproteínas de alta densidade
HGF	fator de crescimento hepático
5-HPETE	ácido 5-hidroperoxy-6,8,1-eicosatetranóico
HSS	substância estimuladora hepática
HT	hormônio tireoidiano
ICG	indocyanine green
IGF	fator de crescimento semelhante à insulina
IGFI	fator de crescimento semelhante à insulina I
IGFII	fator de crescimento semelhante à insulina II
IGFIR	receptor para o fator de crescimento semelhante à insulina I
IGFIIR	receptor para o fator de crescimento semelhante à insulina II
IGFBP-1	fator de crescimento semelhante à insulina ligado a proteína 1
IL-1 β	interleucina 1 beta
IL-2.....	interleucina 2
IL-6	interleucina 6
INF- γ	interferon gama
IP	iodeto de propídeo
IRS	insulin receptor substrate
LDH	lactato desidrogenase
LDL	lipoproteínas de baixa densidade
LPO	lipoperoxidação
LPS	lipopolissacarídeo
MDA	malonaldeído
MDH	enzima malato desidrogenase

MEC	matriz extracelular
mL	mililitro
mM	milimolar
MMPs	metaloproteases
mTOR	receptor da rapamicina de mamíferos
MTT	3-[(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide])
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NaOH	hidróxido de Sódio
Neu	neuregulina ou fator de diferenciação
NFATc	fator nuclear de células T ativadas
NF-kB	fator nuclear -kappa B
nm	nanômetro
nM	nanomol
NSAID	agente inflamatório não esteróide
OSM	oncostatina
PBS	solução tampão fosfato
PGA1	prostaglandina A1
PGE1,	prostaglandina E1
PGE2	prostaglandina E2
PGE2 α	prostaglandina E2 alfa
pH	potencial hidrogeniônico
PI.....	iodeto de propídeo
p70 S6	proteína quinase
p107	proteína da família Rb
R ²	coeficiente de correlação
Rb	proteína do retinoblastoma, proteína p105-Rb. A proteína Rb é um gene supressor de tumor extremamente ativo na fase G1 do ciclo celular. Sua função é reprimir a divisão celular formando um complexo de proteínas que bloqueia a passagem de G1 para S. É uma fosfoproteína nuclear que atua normalmente como um inibidor de proliferação celular. A proteína Rb encontra-se ausente em células de retinoblastoma.
RL	radical livre
RNA _m	RNA mensageiro
RNAse...	enzima
SFH	solução de fatores hepatotróficos
SF	grupo controle
S/FH	sem fatores hepatotróficos
SSC.....	side scatter channel
T0	período inicial de cultivo

T3	triiodotironina
T4	tiroxina
TACE	enzima de conversão do fator de necrose tumoral α , também denominado ADAM 17
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARs	substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TBG	globulina ligadora de tiroxina
TCA	ácido tricloroacético
TCPOBOP1	2-bis [2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzeno
TGF α	fator transformador do crescimento-alfa
TGF β	fator transformador do crescimento beta
TGO	transaminases Glutâmico-Oxalacética
TGP	transaminases Glutâmico-Pirúvica
TIMP3	metaloprotease 3 tecidual
TSH	hormônio estimulante da tireóide
U	unidade
U/A	unidade amilolítica
VIC	verde de indocianina
v/v	volumes iguais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	(A) Vísceras abdominais de rato macho <i>in situ</i> . 1. Tórax, 2. Processo xifóide, 3. Fígado, 4. Estômago, 5. Omento. 6. Baço, 7. Ceco. 8. Colo. 9. Intestino delgado. 10. Gordura, 11. Vesícula urinária. 12. Próstata. 13. Prepúcio, 14. Pênis, 15. Bolsa escrotal, (B) Disposição do trato alimentar dentro do abdômen. 2. Fígado, 3. Baço, 4. Estômago, 5. Parte do pâncreas no omento gastro-esplênico, 6. Duodeno, 7. Íleo, 8. Mesentério, 9. Ceco 10. Cólon, 11. Reto, 12. Útero, 13. Gordura, 14. Vesícula urinária, (C). Diaframa visualizado pelo lado abdominal. 2. Ligamento falciforme, 3. Coração 4. Pulmão, 5. Parte tendinosa central do diafragma, 6. Parte muscular do diafragma. 7. Veias frênicas, 8. Fígado, (D). Estômago, fígado e outras estruturas associadas. 1-4. Lobos do fígado: 1. Lobo esquerdo, 2. Lobo médio, 3. Lobo direito, 4. Lobo caudado. 5. Esôfago, 6. Estômago, 7. Baço, 8. Píloro, 9. Ducto biliar, 10. Duodeno, 11. Pâncreas.....	35
Figura 2 –	Esquema demonstrando arquitetura do fígado	36
Figura 3 –	Corte histológico de um lóbulo hepático de um suíno	38
Figura 4 -	Hepatócito visualizado por microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	39
Figura 5 -	Estrutura do lóbulo hepático (Dorrell, Grompe, 2006). (A) A tríade portal consiste de ductos biliares, artéria hepática e veia portal (Dorrell, 2006). Sangue oriundo da artéria hepática e veia porta misturam-se e atravessam os hepatócitos. O canal de Hering é a junção entre a placa hepática e o ducto biliar. Esta é a região onde as células precursoras ovais residem. (B) Cada lóbulo hepático é formado por uma veia central rodeada por 6 tríades portais.....	41
Figura 6 -	Rede de citocinas, fatores de crescimento e metabólitos durante a regeneração hepática. A regeneração eficiente do fígado envolve três redes; citocina (amarelo), fator de crescimento (vermelho) e metabólitos (branco). Moléculas representativas que participam de cada rede são mostradas com ativação dos perfis desenhados como ondas, indicando que as redes são transitoriamente ativadas após hepatectomia parcial.....	43
Figura 7-	Vias de sinalização de fatores de crescimento durante a regeneração do fígado. Estimulação dos receptores tirosina quinase para HGF (c-met) e dos ligantes de EGF, TGF α , HB-EGF e o AR, (EGFR) ativa numerosas vias de sinalização intracelular que regulam os fatores de transcrição envolvidos na regeneração do fígado. HGF, fator de crescimento de hepatócitos; EGF, fator de crescimento epidérmico, TGF α , fator transformador de crescimento alfa; HB-EGF fator de crescimento epidérmico ligado a heparina; AR, anfiregulina; mTOR, receptor mamífero de rapamicina	53

Figura 8 -	Processo de regeneração hepática pós hepatectomia parcial experimental	55
Figura 9 -	Mecanismo para ativação de EGFR através da atividade TACE (enzima de conversão do fator de necrose tumoral α , também denominado ADAM 17). A ligação de TNF ao seu receptor ativa NF- κ B e AKT, estimulando a produção de citocinas e sobrevivência (A). TNF também ativa TACE, que cliva TGF α ligado à membrana. A molécula TGF α clivada, ativa e vincula o EGFR - um receptor tirosina quinase - levando a ativação de ERK1/2 (B). Cooperação entre citocina (TNF) e fator de crescimento (EGF ligante) ativa via de sinalização que são necessárias para a sobrevivência de hepatócito, crescimento e proliferação. EGFR, receptor de fator de crescimento epidérmico; TACE, enzima de conversão do fator de necrose tumoral α , também denominado ADAM 17); NF- κ B, fator nuclear-kappaB; TNF, fator de necrose tumoral; TGF α , fator transformador de crescimento alfa; ERK1/2, sinal extracelular-regulado por quinase 1/2.....	58
Figura 10 -	Células oriundas do compartimento biliar (ductulos portais e canais de Hering) transformam-se em células ovas e estas em hepatócitos quando a proliferação é inibida durante a regeneração. Hepatócitos periportais podem também se transformar em células biliares, mas a capacidade delas se autogenerar está inibida. Hepatócitos e colangiócitos são células tronco facultativas entre elas mesmas.....	81
Figura 11 -	(A) Gradiente de densidade Percoll; (B) Anel de hepatócitos (seta)	92
Figura 12 -	Avaliação do verde de indocianina (VIC); em (A) Controle meio de cultura e PBS e (B) Sobrenadante da cultura primária de hepatócitos com a adição dos FH na concentração de 1X, 5X e 10X	95
Figura 13 -	Placa espelho com sobrenadante da cultura de hepatócitos para posterior avaliação da mensuração de colágeno e a formação de radicais livres pela peroxidação lipídica.....	97
Figura 14 -	(A, B) Aspecto da fixação do sobrenadante secretado pela cultura primária de hepatócitos e (C) curva padrão após a incubação com a solução saturada de Bouin por 1 hora	99
Figura 15 -	(A) Curva padrão de colágeno bovino tipo I (Sigma®) e (B, C, D) Amostras de sobrenadante de 24, 48 e 72 horas de cultura primária de hepatócitos pelo método colorimétrico de Picrossírius-red	100
Figura 16 -	(A) Análise colorimétrica do método de Picrossírius-red em cultura primária de hepatócitos após a adição dos FH, 24 horas, (B) 48 horas e (C) 72 horas.....	101
Figura 17 -	Fases do ciclo celular	105
Figura 18 -	(A) Cultura primária de hepatócitos na concentração 1×10^5 cel/mL; (B) cultura primária de hepatócitos na concentração $2,5 \times 10^5$ cel/mL, célula de aspecto estrelado, (seta); (C) cultura primária de hepatócitos na concentração 5×10^5 cel/mL, barra 50 μ m	112

Figura 19 - (A) Cultura primária de hepatócitos, barra: 25µm, (B) Hepatócitos binucleados corados com GIEMSA, seta dupla, * detalhe do hepatócito binucleado, barra: 30µm	112
Figura 20 - (A) Cultura primária de hepatócitos, material amorfo (seta), barra: 25µm, (B) Cultura primária de hepatócitos, barra: 25µm.....	112
Figura 21- (A), (B), (C) Cultura primária de hepatócitos, barra: 25µm, (D) Cultura primária de hepatócitos, material amorfo (seta) barra: 25µm. (E) Cultura primária de hepatócitos, célula de aspecto estrelado (seta) barra: 25µm; (F) Cultura primária de hepatócitos, grumos multicelulares, barra: 25µm	113
Figura 22 - Cultura primária de hepatócitos – figura de mitose (seta) barra: 25µm.....	114
Figura 23 - Expressão da CK-18 em cultura primária de hepatócitos; (A) Controle, (B) marcação positiva barra: 10µm.....	115
Figura 24 - Reação imunocitoquímica para CK 18 em cultura primária de hepatócitos após 24 horas barra: 5µm; (A,B) 1X, (C) 5X, (D, E, F) 10X	116

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Expressão da citoqueratina 8. <i>Dot plot</i> adquirido pelo programa <i>Cell Quest®</i> e analisado pelo <i>software FlowJo®</i> . Em (A) T0-24h, (B) FH-1X 24h, (C) FH -10X 24h, (D)T0-72h, (E) FH-1X 72h e (F) FH-10X 72h	118
Gráfico 2 -	Gráfico de barra das médias \pm DP da expressão da citoqueratina 8–CK8 da população de hepatócitos da cultura primária, após 24 e 72 horas de tratamento, na presença ou ausência de fatores hepatotróficos (FH) nas concentrações 1X e 10X. N= 3 experimentos independentes. Teste de comparações múltiplas Tukey- Kramer	119
Gráfico 3 –	Expressão da citoqueratina 18 – CK18. Dot Plot adquirido pelo programa <i>Cell Quest®</i> e analisado pelo programa <i>FlowJo®</i> . Em (A) T0-24h, (B) FH-1X 24h (C) FH -10X 24h, (D) T0-72h, (E) FH-1X 72h e (F) FH-10X 72h	120
Gráfico 4 -	Gráfico de barra das médias \pm DP da expressão da citoqueratina 18–CK18 em hepatócitos de cultura primária, após 24 e 72 horas de tratamento, na presença ou ausência de fatores hepatotróficos (FH) nas concentrações 1X e 10X. N= 3 experimentos independentes. Teste de comparações múltiplas Tukey- Kramer	120
Gráfico 5-	Espressão da desmina. <i>Dot Plot</i> adquirido pelo programa <i>Cell Quest®</i> e analisado pelo <i>software FlowJo®</i> . Em (A) T0-24h, (B) FH-1X 24h, (C) FH -10X 24h, (D) T0-72h, (E) FH-1X 72h e (F) FH-10X 72h	121
Gráfico 6 -	Gráfico de barra das médias \pm DP da expressão da desmina em hepatócitos de cultura primária, após 24 e 72 horas de tratamento, na presença ou ausência de fatores hepatotróficos (FH) nas concentrações 1X e 10X. N= 3 experimentos independentes. Teste de comparações múltiplas Tukey- Kramer	121
Gráfico 7 -	Gráficos de barra representativos das médias \pm DP do teste colorimétrico MTT para a avaliação da capacidade proliferativa da cultura primária de hepatócitos, após a adição dos fatores hepatotróficos na concentração de 1X. Experimentos independentes realizados em octoplicatas, n=6	122
Gráfico 8 -	Gráficos de barra representativos das médias \pm DP do teste colorimétrico MTT para a avaliação da capacidade proliferativa da cultura primária de hepatócitos, após a adição dos fatores hepatotróficos na concentração de 5X. Experimentos independentes realizados em octoplicatas, n=6	123
Gráfico 9 -	Gráficos de barra representativos das médias \pm DP do teste colorimétrico MTT para a avaliação da capacidade proliferativa da cultura primária de hepatócitos, após a adição dos fatores hepatotróficos na concentração de 10X. Experimentos independentes realizados em octoplicatas, n=6	124

Gráfico 10 -	Histograma representativo da viabilidade celular pelo método de difusão do iodeto de propídeo (PI) pela membrana celular de hepatócitos. Em (A) T0-24h, (B) FH-1X 24h, (C) FH-10X 24h, (D) T0-72h, (E) FH-1X 72h e (F) FH-10X 72h	126
Gráfico 11 -	Gráfico de barra representativo das médias \pm DP da viabilidade celular pelo método de difusão do iodeto de propídeo (PI) pela membrana celular de hepatócitos, mantidos em cultura primária por 24 e 72 horas, após adição de FH nas concentrações 1X e 10X. Experimentos independentes realizados em triplicata. Teste de múltiplas comparações Tukey-Kramer.....	127
Gráfico 12 -	Cinética da absorção/eliminação em função do tempo do corante verde de indocianina (VIC) em cultura primária de hepatócitos, após a adição dos FH, (A) concentração de 1X, (B) 5X e (C) 10X durante 24 horas de cultivo	128
Gráfico 13 -	Cinética da absorção/eliminação em função do tempo do corante verde de indocianina (VIC) em cultura primária de hepatócitos, após a adição dos FH (A) concentração de 1X, (B) 5X e (C) 10X, durante 48 horas de cultivo	129
Gráfico 14 -	Cinética da absorção/eliminação em função do tempo do corante verde de indocianina (VIC) em cultura primária de hepatócitos, após a adição dos FH, (A) na concentração de 1X, (B) 5X e (C) 10X, durante 72 horas de cultivo	130
Gráfico 15 -	Determinação da concentração do reativo de TBARS (expressos em nmol/mL) em sobrenadante de cultura de hepatócitos após adição dos FH, (A) na concentração de 1 X, (B) 5X e (C) 10X, nos diferentes períodos de cultivo	131
Gráfico 16 -	Gráficos de barra representativos das médias \pm DP do teste do Picrossirius-red para a avaliação da produção de colágeno na cultura primária de hepatócitos, após a adição dos fatores hepatotróficos nas concentrações de 1X, 5X e 10 X,(A) 24horas, (B) 48 horas e (C) 72 horas de cultivo. Experimentos independentes realizados em octoplicatas, n=6.....	133
Gráfico 17 -	Gráfico representativo das médias \pm DP da expressão do fosfolípídeo anexina-V em (A), para a avaliação da apoptose na cultura primária de hepatócitos, após 24 horas da adição dos fatores hepatotróficos nas concentrações de 1X, 5X e 10X, n=5	135
Gráfico 18 -	Gráfico representativo das médias \pm DP de células necróticas na cultura primária de hepatócitos, após 24 horas da adição dos fatores hepatotróficos nas concentrações de 1X, 5X e 10X, n=5	136
Gráfico 19 -	Gráfico da relação FL1-H (Anexina V-FITC) e FL2-H (IP) em culturas primárias de hepatócitos, após 24 horas da adição dos fatores hepatotróficos, (A) células em apoptose, (B) células mortas, (C) células viáveis e (D) células mortas por necrose.....	136
Gráfico 20 -	Gráfico adquirido pelo programa <i>Cell-Quest</i> em citômetro FACSCALIBUR-BD. Controle positivo - Células de melanoma B16F10 tratados com os quimioterápicos Etoposídeo e Paclitaxel. No quadrante (A) células apoptóticas (B) células em processo de morte, em anexinaV/PI (+), em (C) células viáveis e em (D) células necróticas.....	137

Gráfico 21 -	Gráfico das médias \pm DP das populações celulares apoptóticas e/ou necróticas das células de melanoma B16F10 tratadas com os quimioterápicos Etoposide e Paclitaxel (controle positivo)	137
Gráfico 22 -	Histograma representativo após análise no programa <i>FlowJo</i> ®, mostrando a distribuição do conteúdo de ADN nas fases do ciclo celular na cultura primária de hepatócitos com adição dos FH na concentração de 1X, após 24 horas de tratamento	140
Gráfico 23 -	Gráfico representativo das médias \pm DP das fases do ciclo celular da cultura primária de hepatócitos do grupo controle (A) e, após a adição dos fatores nutricionais nas concentrações de 1X (B), 5X (C) e 10X (D), durante 24 horas de tratamento	141
Gráfico 24 -	Gráfico representativo das médias \pm DP das fases do ciclo celular da cultura primária de hepatócitos do grupo controle (A) e, após a adição dos fatores hepatotróficos nas concentrações de 1X (B), 5X (C) e 10X (D), durante 48 horas de tratamento.....	142
Gráfico 25 -	Gráfico representativo das médias \pm DP das fases do ciclo celular na cultura primária de hepatócitos do grupo controle (A) e, após a adição dos FH nas concentrações de 1X (B), 5X (C) e 10X (D), durante 72 horas de tratamento.....	143
Gráfico 26 -	Histograma representativo da curva de potencial da membrana mitocondrial marcado com Rodamina 123, adquirido pelo programa <i>Cell Quest</i> ® e analisado pelo Teste Kolmogorov-Smirnov. As curvas representam os diferentes potenciais da membrana dos hepatócitos tratados e não tratados com FH nas concentrações 1X(A) e 10X (B) após 24 horas de cultura	144
Gráfico 27 -	Histograma representativo da curva de potencial da membrana mitocondrial marcado com Rodamina 123, adquirido pelo programa <i>Cell Quest</i> ® e analisado pelo Teste Kolmogorov-Smirnov. As curvas representam os diferentes potenciais da membrana dos hepatócitos tratados e não tratados com FH nas concentrações 1X (A) e 10X (B) após 72 horas de cultura.....	145
Gráfico 28 -	Histograma representativo comparativo do potencial da membrana mitocondrial Rodamina 123, adquirido pelo programa <i>Flow Jo</i> ® dos hepatócitos tratados e não tratados com FH nas concentrações 1X e 10X, após 24 horas (A) e 1X e 10X, após 72 horas (B)	146
Gráfico 29 -	Gráfico de barra das médias \pm DP da atividade do potencial da membrana mitocondrial de hepatócitos de cultura primária, após 24 e 72 horas de tratamento, na presença ou ausência de fatores hepatotróficos nas concentrações 1X e 10X. Experimentos independentes realizados em triplicata.....	147

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da solução de fatores hepatotróficos (SFH)	94
Tabela 2 - Expressão dos marcadores de citoesqueleto citoqueratinas 8, 18 e desmina, em cultura primária de hepatócitos mantidos por 24 e 72 horas após a adição de fatores hepatotróficos (FH) nas concentrações 1X e 10X por citometria de fluxo	117
Tabela 3 - Análise da viabilidade das culturas primárias de hepatócitos tratadas com as concentrações de 1X, 5X e 10X dos FH, nos diferentes períodos e analisadas pelo método colorimétrico – MTT	124
Tabela 4 - Análise da viabilidade celular pelo método de difusão do iodeto de propídeo (PI) pela membrana celular de hepatócitos mantidos em cultura primária por 24 e 72 horas, após a adição de FH nas concentrações 1X e 10X por citometria de fluxo	126
Tabela 5 - Médias \pm DP das fases do ciclo celular das culturas primárias de hepatócitos dos grupos S/FH e FH nas concentrações 1X, 5X e 10X, após 24 horas de tratamento	140
Tabela 6 - Médias \pm DP das fases do ciclo celular das culturas primárias de hepatócitos dos grupos S/FH e FH nas concentrações 1X, 5X e 10X, após 48 horas de tratamento	141
Tabela 7 - Médias \pm DP das fases do ciclo celular das culturas primárias de hepatócitos dos grupos S/FH e FH nas concentrações 1X, 5X e 10X, após 72 horas de tratamento	142
Tabela 8 - Análise da média \pm DP da atividade do potencial de membrana mitocondrial de hepatócitos mantidos em cultura primária por 24 e 72 horas, após a adição de FH nas concentrações 1X e 10X por citometria de fluxo	147
Tabela 9 - Análise bioquimicoenzimática das culturas primárias de hepatócitos, após a adição de FH 1X e 10X, 24 e 72 horas de tratamento	149

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	OBJETIVOS	32
2.1	OBJETIVOS GERAIS	32
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3	REVISÃO DE LITERATURA	34
3.1	MORFOLOGIA DO FÍGADO	34
3.2	FISIOLOGIA DO FÍGADO	39
3.3	REGENERAÇÃO HEPÁTICA E FATORES HEPATOTRÓFICOS	41
3.3.1	Tipos de Fatores de Crescimento do Fígado	61
3.3.1.1	Agentes mitogênicos	61
3.3.1.1.1	<i>Fator de Crescimento Epidérmico (EGF – Epidermal Growth Factor)</i>	62
3.3.1.1.2	<i>Fator Transformador do Crescimento-alfa (TGFA – Transforming Growth Factor-α)</i>	62
3.3.1.1.3	<i>Fator de Crescimento Fibroblastos Ácido (aFGF – acidic Fibroblast Growth Factor)</i>	63
3.3.1.1.4	<i>Fator de Crescimento Hepático (HGF – Hepatocyte Growth Factor)</i>	64
3.3.1.2	Agentes Co-mitogênicos	65
3.3.1.2.1	<i>Substância Estimuladora Hepática (HSS – Hepatic Stimulatory Substance)</i>	65
3.3.1.2.2	<i>Norepinefrina e Receptor α1 Adrenérgico</i>	66
3.3.1.2.3	<i>Vasopressina e Angiotensinas II e III</i>	67
3.3.1.2.4	<i>Insulina e Glucagon</i>	67
3.3.1.2.5	<i>Estrógenos e Progesterona</i>	71
3.3.1.2.6	<i>Agentes Imunossupressores</i>	73
3.3.1.2.7	<i>Prostaglandinas</i>	74
3.3.1.3	Agentes Inibidores do Crescimento	75
3.3.1.3.1	<i>Fator Transformador do Crescimento – beta (TGF-β – Transforming Growth Factor-β)</i>	75
3.3.1.3.2	<i>Interleucina 1β</i>	77
3.3.1.3.3	<i>Fatores de Crescimento Parcialmente Caracterizados</i>	77
3.4	TRATAMENTO DO FÍGADO	77
4	MATERIAL E MÉTODOS	88
4.1	ANIMAIS	88
4.2	COLHEITA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	88
4.3	CULTIVO CELULAR	89
4.3.1	Isolamento dos hepatócitos	89
4.3.2	Caracterização celular imunocitoquímica e citometria de fluxo para avaliação da citoqueratina 8, 18 e desmina	90
4.3.3	Procedimento experimental	93

4.3.3.1	Metabolismo celular e parâmetros celulares.....	94
4.3.3.2	Depuração do verde de indocianina (ICG-Cardiogreen®)	95
4.3.3.3	Método colorimétrico MTT	96
4.3.3.4	Quantificação de colágeno por espectrofotometria com Picrossírius-red	97
4.3.3.5	Medida da lipoperoxidação <i>in vitro</i> (LPO)	101
4.3.4	Análise das fases do ciclo celular das culturas primárias de hepatócitos após a adição dos FH estudados, por citometria de fluxo	103
4.3.4.1	Fases do ciclo celular – Interfase.....	103
4.3.4.2	Regulação do ciclo celular.....	104
4.3.5	Avaliação da Atividade Apoptótica – Anexina V	106
4.3.6	Determinação do potencial da membrana mitocondrial	107
4.3.7	Determinação bioquímica das transaminases hepáticas, gama glutamil transferase e amilase	108
4.3.8	Análise Estatística	109
5	RESULTADOS	111
5.1	DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DAS CULTURAS PRIMÁRIAS NAS CONCENTRAÇÕES 1X, 5X E 10X DOS FH NOS INTERVALOS DE 24, 48 E 72 HORAS	111
5.2	IMUNOCITOQUÍMICA E CITOMETRIA DE FLUXO PARA AS CITOQUERATINAS 8, 18 E DESMINA.....	114
5.3	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO – MTT E CITOTOXIDADE EM CITOMETRIA DE FLUXO	122
5.3.1	Efeitos citotóxicos e proliferativos dos fatores hepatotróficos (FH) em culturas primárias de hepatócitos	124
5.4	A CAPACIDADE DE METABOLIZAÇÃO HEPÁTICA DO VERDE DE INDOCIANINA	127
5.5	DETERMINAÇÃO DA FORMAÇÃO DE PERÓXIDOS LIPÍDICOS POLIINSATURADOS DO SOBRENADANTE DA CULTURA DE HEPATÓCITOS.....	131
5.6	QUANTIFICAÇÃO COLORIMÉTRICA DE COLÁGENO.....	132
5.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE APOPTÓTICA – ANEXINA V/PI	134
5.8	ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR DE HEPATÓCITOS APÓS A ADIÇÃO DOS FATORES HEPATOTRÓFICOS, POR CITOMETRIA DE FLUXO	138
5.9	ATIVIDADE DO POTENCIAL ELÉTRICO DA MITOCÔNDRIA	143
5.10	AVALIAÇÃO DO PERFIL BIOQUÍMICOENZIMÁTICO DE HEPATÓCITOS CULTIVADOS COM FATORES HEPATOTRÓFICOS	148
6	DISCUSSÃO	151
7	CONCLUSÕES	167
	REFERÊNCIAS	169
	ANEXOS	209

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O fígado exerce uma função fundamental na regulação da nutrição do corpo por vias bioquímicas coordenadas, responsáveis pelo metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Seu principal suprimento sanguíneo é oriundo da circulação portal, que recebe nutrientes absorvidos pelos intestinos, e do sangue fornecido pela artéria hepática, representando a maior fonte de oxigênio para o fígado. Os nutrientes são metabolizados, armazenados ou distribuídos aos tecidos periféricos. No período de jejum, por exemplo, transferem-se os nutrientes armazenados dos tecidos, principalmente aminoácidos dos músculos e ácidos graxos do tecido adiposo, para o fígado, são metabolizados e servem de aporte energético aos tecidos periféricos. O conhecimento básico das funções metabólicas do fígado é essencial para o entendimento de distúrbios metabólicos e manejo nutricional durante a doença hepática (ROMBEAU; ROLANDELLI, 2004).

Neste contexto, a avaliação dos efeitos de substâncias hepatotróficas pode ser feita com o uso de modelos *in vivo*, como a regeneração hepática após a hepatectomia parcial (COGLIATI et al., 2004a) ou *in vitro*, como a cultura de hepatócitos, células estreladas ou outros tipos celulares do fígado ((RICCALTON-BANKS et al., 2003). A cultura é um modelo útil por possibilitar a análise individualizada de determinadas substâncias ou soluções diretamente nas células-alvo, facilitando o delineamento de seu mecanismo de ação. Por exemplo, Tang et al. (2003) testaram os efeitos de nicotinamida (NA) e do dimetilsulfóxido (DMSO) que em cultura de hepatócitos é capaz de controlar a proliferação de hepatócitos estimulados por hepatopoiatina (HPN) (SANTOS et al., 2003). Esses resultados podem ser utilizados no metabolismo de hepatócitos humanos, na citotoxicidade, biotransformação e mutagênese, propiciando evidências experimentais para o tratamento de insuficiência hepática e doenças genéticas com hepatócitos clonados *in vitro*.

Além destes processos intrínsecos que comandam e controlam a divisão celular e regeneração hepática, fatores extrínsecos como os de origem nutricional também atuam no fígado, modificando ou acionando respostas proliferativas e regenerativas (HOLECEK, 1999). A terapia nutricional é bem estabelecida em tratamentos de doenças hepáticas crônicas, sendo que seu prognóstico se

correlaciona com a gravidade da desnutrição. Assim, a suplementação alimentar pode melhorar o estado nutricional, imunológico e a função hepática desses pacientes (NOMPLEGGI; BONKOVSKY, 1994).

A suplementação nutricional geralmente é realizada pela nutrição enteral, cujos benefícios dos efeitos tróficos ao intestino e fígado pelo efeito de primeira passagem dos nutrientes já é conhecido. Porém, pacientes com doença hepática grave ingerem quantidade insuficiente de nutrientes, levando à anorexia e encefalopatia crônica. O fornecimento adequado de proteínas faz-se necessário para a correção da desnutrição, auxiliando a síntese protéica e a regeneração hepática. Desta maneira, a nutrição parenteral pode ser essencial para pacientes com falência hepática aguda, desnutrição grave ou no perioperatório (ROMBEAU; ROLANDELLI, 2004).

Assim, diversos autores preconizam o uso de fatores nutricionais e hormonais no auxílio à regeneração hepática, como soluções enriquecidas com glicose e aminoácidos (BIRKHAHN et al., 1994), com glutamina, insulina e glucagon (YAMAGUCHI; MINOR; ISSELHARD, 1997).

O estudo da fisiologia da regeneração hepática e a descoberta de vários fatores que influenciam o crescimento e o trofismo do fígado, chamados fatores hepatotróficos, abriram a perspectiva de se poder intervir diretamente no processo de regeneração deste órgão, criando-se um recurso auxiliar na superação das limitações inerentes ao tratamento cirúrgico (CORPECHOT et al., 2002).

Tendo em vista as diversas potencialidades da suplementação parenteral em pacientes portadores de doenças hepáticas graves, este trabalho avaliou os efeitos do tratamento com a solução de fatores hepatotróficos no metabolismo e na proliferação celular em hepatócitos isolados de ratos normais, mantidos em condições de cultura celular, como modelo *ex vivo* para estudos em afecções hepáticas.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar *in vitro* os efeitos dos fatores hepatotróficos (FH) em culturas primárias de hepatócitos de ratos normais quanto à capacidade de proliferação celular, à expressão de marcadores característicos, às fases do ciclo celular, à função e metabolização hepática e a indução de radicais livres.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

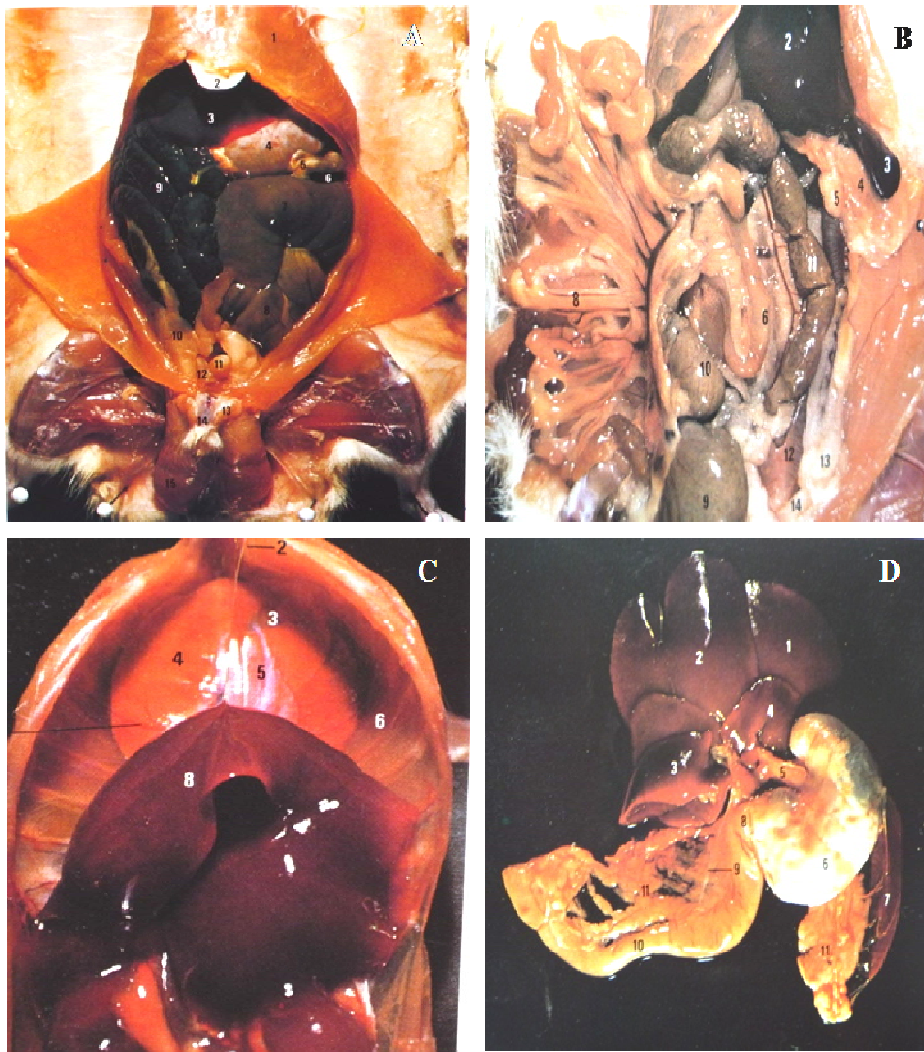
- ✓ Obtenção e caracterização das culturas primárias de hepatócitos isolados de fígados de ratos normais;
- ✓ Expressão de marcadores citoqueratina 8, 18 e desmina por imunocitoquímica e citometria de fluxo;
- ✓ Viabilidade/Proliferação pelo método colorimétrico (MTT) e por citometria de fluxo;
- ✓ Fases do ciclo celular por citometria de fluxo;
- ✓ Expressão de marcadores de morte celular e necrose - Anexina V e PI;
- ✓ Atividade do potencial elétrico da membrana mitocondrial pela técnica de absorção de rodamina;
- ✓ Produção de colágeno por meio da quantificação de colágeno por espectrofotometria com Picrossirius-red;
- ✓ Peroxidação lipídica por meio da quantificação espectrofotométrica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no sobrenadante da cultura de hepatócitos;
- ✓ Atividade metabólica do verde de indocianina (absorção e depuração) e das enzimas hepáticas (GGT, ALT, AST e amilase).

Revisão de Literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 MORFOLOGIA DO FÍGADO

O fígado é o maior órgão sólido do corpo, constituindo aproximadamente de 2% a 5% do peso do corpo de um homem adulto. Nos animais varia de acordo com a espécie; 2% no gato, 3 a 4% no cão, 2 a 3% no suíno, 1 a 1,5% nos herbívoros (KÖNIG; LIEBICH, 2004), 5% no camundongo (DESMET, 1994) e no rato de 200g 4% do peso corporal (ALOIA; DAGLI; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, 2009). No feto, o fígado é excepcionalmente volumoso, ocupando amplo espaço da cavidade abdominal. Durante o período embrionário, ele assume a função de formação de sangue - hematopoiese (KÖNIG; LIEBICH, 2004). Pode exercer mais de 100 funções diferentes, a maioria das quais é exercida pelos hepatócitos. Sua anatomia clássica distingue dois lobos principais direito e esquerdo e dois acessórios, quadrado e caudado. Apresenta forma e topografia variáveis nas espécies animais (espécie-específico), com uma face diafragmática convexa e uma face visceral, côncava. Sua maior parte situa-se no antímero direito do corpo, principalmente nos ruminantes, devido ao desenvolvimento do rúmen (KÖNIG; LIEBICH, 2004). Ventrolateralmente, o fígado apresenta uma margem aguda, ao passo que dorsalmente posiciona-se a margem obtusa. A primeira estrutura embrionária reconhecida como precursora do fígado é o divertículo hepático, que se origina do revestimento endodérmico do intestino anterior na quarta semana de gestação (Figura 1). Sua diferenciação cranial dá origem às trabéculas hepáticas, que são cordões de células epiteliais endodérmicas, os hepatoblastos, enquanto que no sentido caudal, formam-se os ductos biliares extra-hepáticos e a vesícula biliar (KÖNIG; LIEBICH, 2004). O fígado recebe um duplo suprimento sanguíneo, constituído pela artéria hepática – ramo do tronco celíaco – e pela veia porta formada pela convergência das duas veias mesentéricas (cranial e caudal) do baço e pancreas. As veias hepáticas drenam para a veia cava caudal (GAYOTTO; ALVES, 2001).

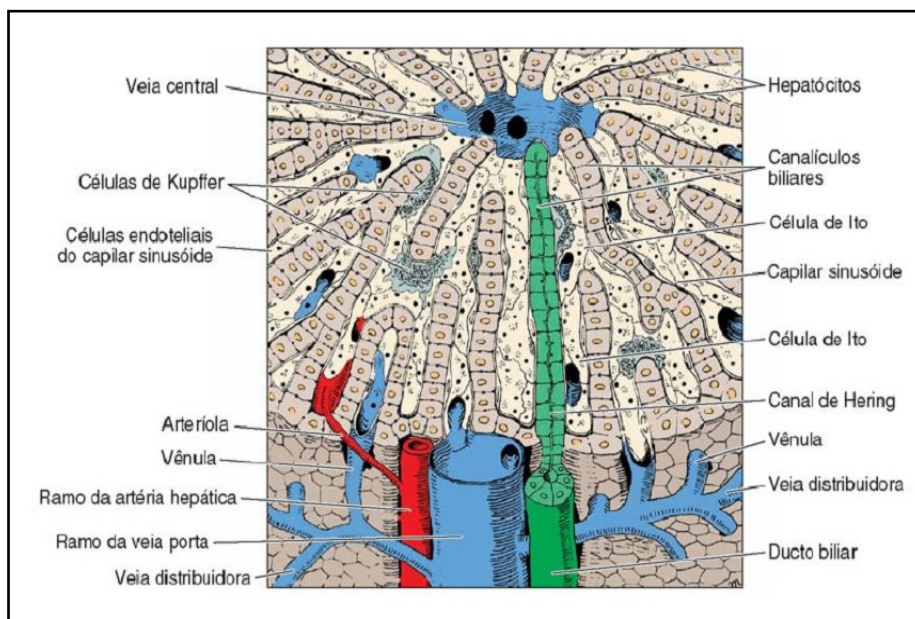


Fonte: OLDS, R. J.; OLDS, J. R. **A colour atlas of the rat**. London: Wolfe Medical Publication, 1979. 112 p.

Figura 1 - (A) Visceras abdominais de rato macho *in situ*. 1. Tórax, 2. Processo xifóide, 3. Fígado, 4. Estômago, 5. Omento. 6. Baço, 7. Ceco. 8. Colo. 9. Intestino delgado. 10. Gordura, 11. Vesícula urinária. 12. Próstata. 13. Prepúcio, 14. Pênis, 15. Bolsa escrotal, (B) Disposição do trato alimentar dentro do abdômen. 2. Fígado, 3. Baço, 4. Estômago, 5. Parte do pâncreas no omento gastro-esplênico, 6. Duodeno, 7. Íleo, 8. Mesentério, 9. Ceco 10. Cólon, 11. Reto, 12. Útero, 13. Gordura, 14. Vesícula urinária, (C). Diafragma visualizado pelo lado abdominal. 2. Ligamento falciforme, 3. Coração 4. Pulmão, 5. Parte tendinosa central do diafragma, 6. Parte muscular do diafragma. 7. Veias frênicas, 8. Fígado, (D). Estômago, fígado e outras estruturas associadas. 1-4. Lobos do fígado: 1. Lobo esquerdo, 2. Lobo médio, 3. Lobo direito, 4. Lobo caudado. 5. Esôfago, 6. Estômago, 7. Baço, 8. Píloro, 9. Ducto biliar, 10. Duodeno, 11. Pâncreas

A unidade funcional do fígado é o lóbulo hepático e cada lóbulo é constituído de uma massa poliédrica de tecido hepático (MALL, 1906). As regiões nos cantos dos poliedros são denominadas espaço porta ou tríade portal, que consiste de uma pequena veia portal, artéria hepática e ducto biliar (WISSE, 1970). Essas células epiteliais se agrupam em placas que se anastomosam entre si formando unidades

morfológicas, os lóbulos hepáticos. Nos lóbulos, os hepatócitos são células poligonais com aproximadamente 20 a 30 μm de diâmetro, que se dispõem em placas orientadas radialmente. Uma fileira de hepatócitos forma uma placa hepática. Cada placa é constituída por células dispostas em uma só camada que são perfuradas e, frequentemente, anastomosam-se, formando um labirinto complexo, que dá ao lóbulo hepático um aspecto esponjoso figura 2.



Fonte: Junqueira e Carneiro (2004).

Figura 2 – Esquema demonstrando arquitetura do fígado

No espaço compreendido entre as placas de células hepáticas localizam-se os chamados sinusóides, ou seja, capilares hepáticos de paredes revestidas por dois tipos celulares: as células endoteliais típicas dos capilares sanguíneos e macrófagos que, neste órgão são chamados de células de Kupffer. As células de Kupffer são estreladas, de núcleo oval grande e nucléolo evidente possuem intensa atividade fagocitária, pertencendo ao Sistema Mononuclear Fagocitário. Estas células estreladas fagocitam hemácias em via de desintegração, com a conseqüente digestão de hemoglobina e produção de bilirrubina, resíduos potencialmente obstrutivos e material particulado. Além disso, reconhecem e endocitam cerca de 99% dos microorganismos do sangue da veia porta. Apresentam também grande quantidade de lisossomas que contém no seu interior as enzimas necessárias para a digestão intracelular. Muitos desses macrófagos derivados de monócitos são incorporados ao revestimento dos sinusóides; outros estão distendidos através do lúmen. As células endoteliais sinusoidais são responsáveis por 15% a 20% do

número total de células hepáticas. São separadas dos hepatócitos pelo espaço de Disse, que é um compartimento de fluido extravascular dentro do qual os hepatócitos projetam microvilosidades, carecem de junções intercelulares, não têm membrana basal, contêm várias e grandes fenestrações. Esta disposição possibilita o contato máximo das membranas do hepatócito, extravascular (espaço de Disse), com o sangue no espaço sinusoidal. Estes vasos facilitam a interação entre o sangue e a superfície da célula hepática (WISSE, 1970).

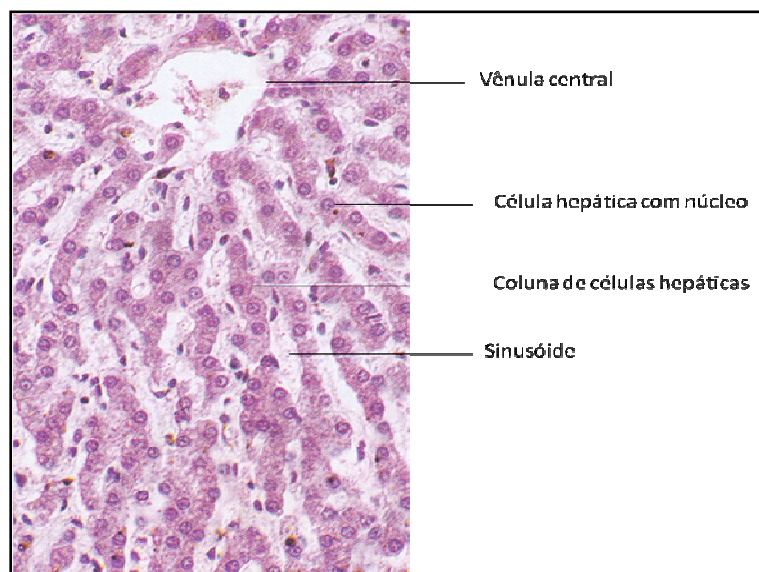
No estreito espaço que separa a parede dos capilares sinusóides dos hepatócitos se encontra o espaço de Disse (espaço extravascular) onde se localizam as células estreladas hepáticas (CEH) ou células de Ito, que armazenam vitamina A em suas gotículas lipídicas. As CEH são células perisinusoidais, produzem fatores de crescimento, citocinas, prostaglandinas e outras substâncias bioativas. Podem sofrer um processo de ativação para um fenótipo semelhante à miofibroblastos. Quando ativadas apresentam maior capacidade de proliferação, motilidade, contractilidade, síntese de colágeno e componentes da matriz extracelular. Possuem processos citoplasmáticos aderidos aos sinusóides e podem afetar o fluxo sangüíneo sinusoidal. As CEH são importantes na patogênese da fibrose e hipertensão portal. Em resposta a lesão hepática, estas células que contêm gorduras podem proliferar, tornam-se contráteis e produzem fibras colágenas. Podem sofrer um processo de ativação para um fenótipo semelhante à miofibroblastos. Quando ativadas apresentam maior capacidade de proliferação, motilidade, contractilidade, síntese de colágeno e componentes da matriz extracelular. Possuem processos citoplasmáticos aderidos aos sinusóides e podem afetar o fluxo sangüíneo sinusoidal. As CEH são importantes na patogênese da fibrose e hipertensão portal. Em resposta a lesão hepática, estas células que contêm gorduras podem proliferar, tornam-se contráteis e produzem fibras colágenas. Elas desempenham um papel principal na extensa fibrose com progressiva ruptura do parênquima que caracteriza a cirrose, doença hepática potencialmente fatal (do grego *kirrhos*, marrom-alaranjado; *ōsis*, condição) (CORMACK, 2003; GARTNER; HIAT, 2003; BRANDÃO et al., 2006, MICHALOPOULOS, 2007).

As CEH segregam vários mitógenos de hepatócitos incluindo HGF - fator de crescimento hepático (SCHIRMACHER et al., 1992; MAHER, 1993); EGF – fator de crescimento epidérmico (BACHEM et al., 1992; MEYER; BACHEM; GRESSNER, 1990; MULLHAUPT et al., 1994) epimorfina (YOSHINO et al., 2006), e pleiotrofina

(ASAHINA et al., 2002). No entanto, sua contribuição relativa e os modos de regulação durante a regeneração hepática não foram esclarecidos.

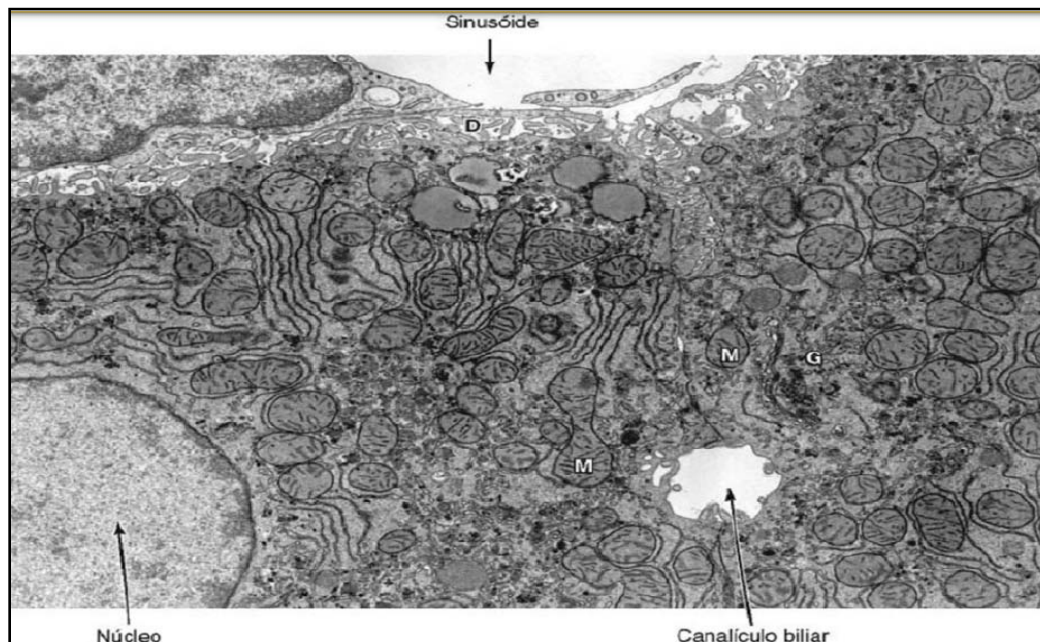
Os espaços de Disse conectam-se com os vasos linfáticos nos septos interlobulares, por conseguinte, o excesso de líquido nesses espaços é removido pelos linfáticos. Os sinusóides hepáticos medem entre 10 e 30µm de diâmetro, possuem endotélio fenestrado, que se assenta sobre uma membrana basal descontínua (HIB, 2003). Nos sinusóides desembocam ramos capilares terminais da artéria hepática que trazem oxigênio para o parênquima hepático. Os capilares sinusóides desembocam na veia centrolobular, no centro do lóbulo. O fígado recebe sangue pela veia porta (70%) e uma porção menor pelas artérias hepáticas. Pela veia porta chega ao fígado todo material absorvido pelo intestino, com exceção dos lipídios que é transportado por via linfática (GUYTON; HALL, 2002; CORMACK, 2003; GARTNER; HIAT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A face apical de hepatócitos adjacentes forma os canalículos biliares. A bile secretada pelos hepatócitos circula pelos canalículos biliares até a periferia do lóbulo hepático, isto é, em direção contrária à do sangue dos sinusóides. Quando chega à periferia do lóbulo, a bile ingressa em ductos excretores curtos, conhecidos como ductos (ou canais) de Hering. Estes desembocam em ductos maiores, chamados ductos biliares perilobulares, os quais – do mesmo modo que as arteríolas e as vênulas terminais – correm entre as faces laterais dos lóbulos. Após atravessar a lâmina terminal dos espaços porta, os ductos biliares perilobulares desembocam perpendicularmente nos ductos biliares interlobulares destes espaços (HIB, 2003; DUNCAN; DORRELL; GROMPE, 2009) (Figuras 3 e 4).



Fonte: König e Liebich (2004)

Figura 3 – Corte histológico de um lóbulo hepático de um suíno



Fonte: Junqueira e Carneiro (2004).

Figura 4 - Hepatócito visualizado por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

3.2 FISILOGIA DO FÍGADO

A maior função metabólica do fígado envolve a degradação de aminoácidos, carboidratos, lipídios, a síntese de lipoproteínas, a degradação de hormônios esteróides e a detoxificação de drogas e toxinas, vitaminas e seu subsequente estoque, conversão metabólica, e liberação para o sangue e bile (MICHALOPOULOS; DEFRANCES, 1997; TAUB, 2004; MICHALOPOULOS; KHAN, 2005; FAUSTO; CAMPBELL; RIELLE, 2006). A bile desempenha um importante papel na digestão de lipídios. Todavia, muitas das funções do fígado estão interrelacionadas, o que se torna particularmente evidente quando surgem anormalidades do fígado, visto que muitas de suas funções são afetadas simultaneamente (ROUILLER, 1964; GUYTON; HALL, 2002; GARTNER; HIAT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MICHALOPOULOS, 2007).

O órgão é dividido em setores e segmentos com independente suprimento sangüíneo e biliar aferente e eferente sem circulação colateral entre os segmentos. A organização funcional do fígado reflete-se em diversas funções

(MICHALOPOULOS; DEFRANCES, 1997; TAUB, 2004; MICHALOPOULOS; KHAN, 2005; FAUSTO; CAMPBELL; RIELLE, 2006).

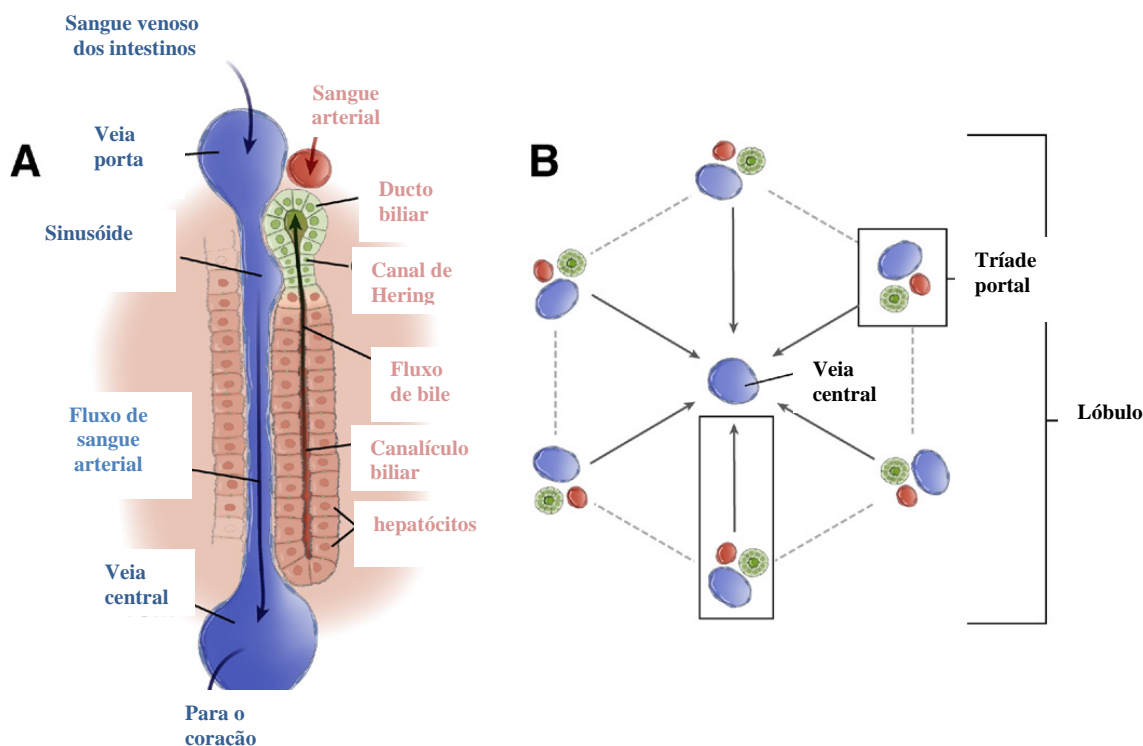
A função do hepatócito varia de acordo com sua localização dentro do lóbulo hepático. A constatação dessa diversidade entre os hepatócitos levou à formulação do modelo do zoneamento metabólico do fígado, propondo que os hepatócitos periportais e perivenosos exercem funções metabólicas diferentes, o que facilitaria o controle do metabolismo (JUNGERMANN, 1992).

Zoneamento metabólico refere-se a diferentes propriedades dos hepatócitos da região periportal (adjacente à tríade portal) e pericentral (adjacente à veia centro lobular) (JUNGERMANN, KIETZMANN, 1996). Hepatócitos periportais, por exemplo, expressam enzimas do ciclo da uréia e convertem amônia em uréia (MOORMAN et al., 1989; HAUSSINGER; LAMERS; MOORMAN, 1992). Por outro lado, hepatócitos pericentraes expressam a enzima glutamina sintetase e utilizam a amônia para gerar glutamina (MOORMAN et al., 1989). O padrão de expressão gênica em hepatócitos depende da direção do fluxo sanguíneo (THURMAN; KAUFFMAN, 1985). Adequado fluxo sanguíneo parece ter muita importância na regeneração hepática. Richardson e Withrington (1982) demonstraram que a redução do suprimento sanguíneo leva à menor taxa de regeneração (RARES et al., 1976). Sato et al. (1997) afirmam que a pressão portal, a qual reflete o volume sinusoidal, pode representar o controle da regeneração do volume hepático.

O mecanismo da absorção dos nutrientes por via parenteral deve-se, principalmente, à presença de um endotélio fenestrado nos sinusóides hepáticos, que expõe os hepatócitos diretamente a uma série de fatores hepatotróficos (MICHALOPOULOS; DEFRANCES, 1997; MICHALOPOULOS, 2007), como nutrientes, citocinas, hormônios e fatores de crescimento (HOLECEK, 1999; FAUSTO; CAMPBELL; RIEHLE, 2006).

Este sistema permite um movimento livre bidirecional de solutos (substâncias de peso molecular alto e baixo) para dentro e para fora dos hepatócitos, promovendo um enorme potencial de filtração. As fenestrações das células endoteliais restringem o movimento das moléculas entre os sinusóides e os hepatócitos e variam em resposta aos mediadores exógenos e endógenos. Porém, acredita-se que nenhuma substância isolada seria suficiente para regular todo o processo regenerativo (RAMALHO et al., 1993; FLADMARK et al., 1997), caracterizando o sinergismo entre nutrientes e fatores de crescimento, como um

importante estímulo à proliferação celular (MAZZA et al., 2003; FAUSTO; CAMPBELL; RIEHLE, 2006; DUNCAN; DORREL; GROMPE, 2009) (Figura 5).



Fonte: DUNCAN; DORRELL; GROMPE, (2009).

Figura 5 - Estrutura do lóbulo hepático (Dorrell, Grompe, 2006). (A) A triáde portal consiste de ductos biliares, artéria hepática e veia porta (Dorrell, 2006). Sangue oriundo da artéria hepática e veia porta misturam-se e atravessam os hepatócitos. O canal de Hering é a junção entre a placa hepática e o ducto biliar. Esta é a região onde as células precursoras ovais residem. (B) Cada lóbulo hepático é formado por uma veia central rodeada por 6 triades portais

3.3 REGENERAÇÃO HEPÁTICA E FATORES HEPATOTRÓFICOS

Na última década, foi observado um aumento de interesse nos mecanismos de regeneração do fígado, gerados a partir de uma ciência biológica e um ponto de vista clínico. Pesquisadores perceberam que a regeneração do fígado constitui um modelo exclusivo para estudar o sinal de eventos de transdução e ciclo celular de forma sincronizada *in vivo*. Do ponto de vista clínico, noções básicas sobre o mecanismo de regeneração do fígado é crucial para o adequado gerenciamento e o desenvolvimento de novas terapias para um número de condições importantes, tais como insuficiência aguda do fígado e cirrose (FAUSTO; CAMPBELL; RIEHLE, 2006).

O termo "hepatotrófico" (grego: nutritivo), usado em 1965, por Marchioro, Porter, Brown, Faris, Herrmann, Sudweeks, Starzl parece ser apropriado para descrever fatores oriundos da circulação portal, pois esta carrega substrato de origem alimentar. O sufixo "trópico" (grego: estimular; transformar) pressupõe mudanças em um organismo, em resposta a um estímulo externo, sendo adequado seu uso quando se quiser referir à ocorrência de hipertrofia e hiperplasia hepática. Muitas substâncias consideradas como "hepatotróficas" têm efeitos sobre outros órgãos-alvo além do fígado, como os hormônios tireoideanos, insulina e glucagon (GORLA JUNIOR et al., 2001).

De um modo geral, os fatores que apresentam efeitos tróficos sobre o fígado se enquadram nestas categorias:

- ✓ Hormônios - hipófise: GH (Growth Hormone – hormônio do crescimento); tireóide: T3 e T4 (triiodotironina e tiroxina); pâncreas: insulina, glucagon e somatostatina; supra-renal: norepinefrina
- ✓ Fatores de Crescimento (Somatomedinas)
- ✓ Nutrientes e sangue mesentérico
- ✓ Drogas de ação hepatotrófica
- ✓ Fígado remanescente: hepatectomia

Conforme sua origem – hepática ou extra-hepática – podem ser caracterizados como endógenos e exógenos (BAKER, 1985). Nenhum fator de crescimento parece agir isoladamente. A maioria deles possui também uma variedade de ações. Alguns estimulam a proliferação, outros estimulam a divisão celular ou agem estimulando ou inibindo na dependência de suas concentrações (ALBERTS et al., 1997).

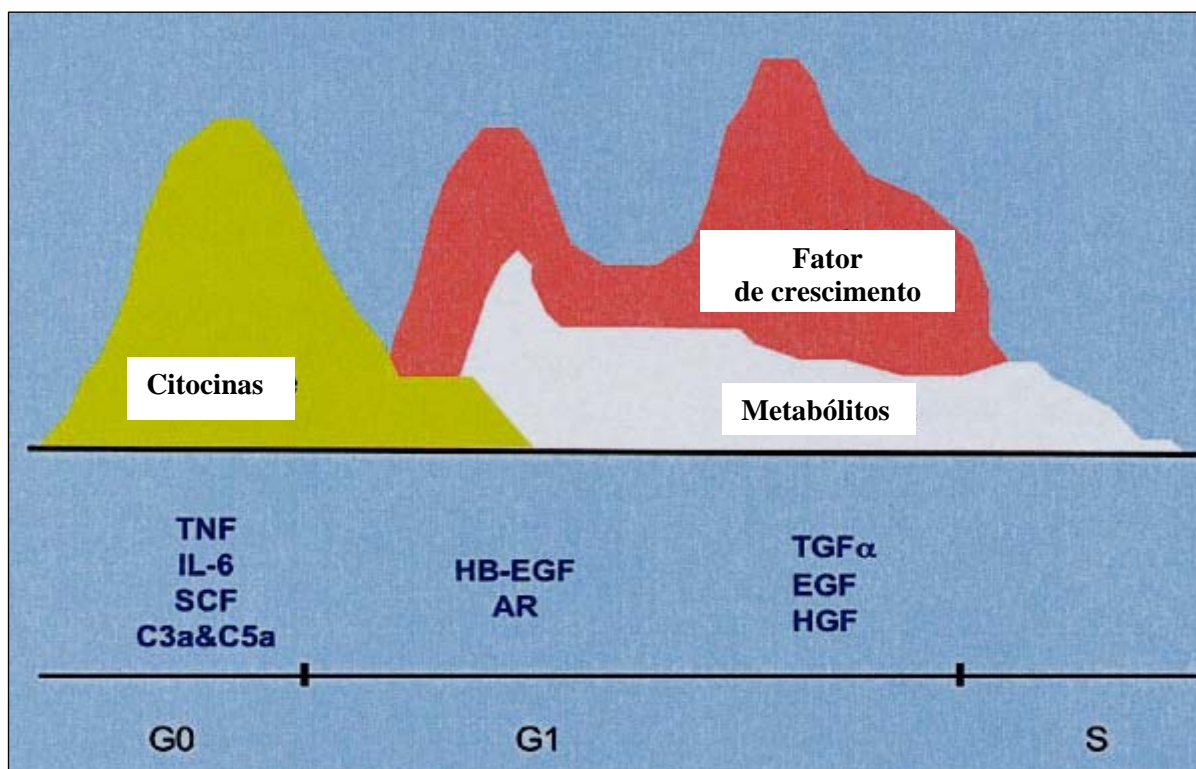
A evolução dos conceitos pertinentes ao mecanismo de regeneração hepática pode ser categorizada dentro de três fases: a) a visão original que um único agente humoral poderia funcionar como uma chave capaz de desbloquear todos os eventos necessários para a regeneração hepática, b) a idéia de que a ativação de uma via envolvendo múltiplos componentes poderia ser responsável pela regeneração e c) a mais recente idéia de que a atividade de múltiplas vias é necessária para a

regeneração hepática (MICHALOPOULOS; DEFRANCES, 1997; FAUSTO, 2000; TAUB, 2004; FAUSTO; CAMPBELL; RIELLE, 2006) (Figura 6).

A regeneração hepática requer a ativação de várias vias de sinalização, que não agem independentemente umas das outras. Os padrões de interação entre estas vias são complexos porque podem envolver simultâneos e/ou seqüenciais modos de operação, pode ocorrer em tipos diferentes de células do fígado, e podem estar presentes apenas em certos estágios da regeneração hepática (FAUSTO; CAMPBELL; RIELLE, 2006; MICHALOPOULOS, 2007).

A literatura recente está repleta de dados que comprovem que a deleção de genes envolvidos em diferentes vias de sinalização pode inibir a regeneração do fígado, levando à noção que este processo requer a ativação de diferentes vias (FAUSTO; CAMPBELL; RIELLE, 2006).

Fausto, Campbell e Rielle (2006) sugeriram que a presença de citocinas, fatores de crescimento e metabólitos seriam responsáveis por uma eficiente regeneração hepática (Figura 6).



Fonte: FAUSTO; CAMPBELL; RIELLE,(2006).

Figura 6 - Rede de citocinas, fatores de crescimento e metabólitos durante a regeneração hepática. A regeneração eficiente do fígado envolve três redes; citocina (amarelo), fator de crescimento (vermelho) e metabólitos (branco). Moléculas representativas que participam de cada rede são mostradas com ativação dos perfis desenhados como ondas, indicando que as redes são transitoriamente ativadas após hepatectomia parcial

Um recurso característico destas redes de sinalização é que existe redundância entre os componentes intracelulares de cada rede, tal que a perda de um gene individual raramente leva a inibição da regeneração do fígado. Em modelos experimentais de hepatectomia parcial (HP) de 2/3 em ratos, estas redes de sinalização podem se modificar e alterar a replicação e proliferação celular. Critérios estabelecidos por estudos genéticos em outros organismos demonstram que nenhum único gene pode ser considerado "essencial" para a regeneração hepática (FAUSTO; CAMPBELL; RIEHLE, 2006).

O termo regeneração, embora comumente usado é biologicamente incorreto, uma vez que a resposta induzida pela ressecção do tecido hepático não é verdadeiramente regenerativa. Os lobos ressecionados não são recuperados. Assim, a regeneração do fígado é tecnicamente um processo de crescimento compensatório, em vez de regenerativo. A restauração da massa hepática ocorre por hiperplasia celular compensatória nos lobos remanescentes, com conseqüente aumento em suas dimensões. Isso sugere que o crescimento hepático seja controlado por fatores funcionais ao invés de fatores estruturais. Qualquer que seja a natureza destes fatores, eles parecem ser bastante precisos, uma vez que o crescimento cessa quando o fígado atinge seu peso original (variável de acordo com a espécie (KÖNIG; LIEBICH, 2004). A proliferação dos hepatócitos não se torna desregulada ou autônoma, nem mesmo após ressecções consecutivas (FAUSTO; CAMPBELL; RIELLE, 2006).

Em 1909, Milne relatou que as alterações patológicas em modelos experimentais onde a destruição de hepatócitos era capaz de desencadear o processo de proliferação hepatocelular. Em 1920a,b, Rous e Larimore reportaram o aumento de volume dos lobos hepáticos não submetidos à ligadura, enquanto o restante do fígado era privado do suprimento portal. A regeneração hepática é um exemplo de crescimento tecidual ordenado e organizado. Pode ser induzida, experimentalmente, por qualquer tratamento agudo, cirúrgico ou químico, o qual remova ou destrua um grande percentual do parênquima hepático. A perda do parênquima rapidamente desencadeia o processo regenerativo até que a massa hepática seja restaurada (ROUS; LARIMORE, 1920a,b; MICHALOPOULOS, 1990; RAMALHO et al., 1998; ROUS et al., 2006).

Após hepatectomia parcial (HP) ou lesões induzidas pelo tetracloreto de carbono (CCl₄) a massa do fígado é alimentada pela replicação de hepatócitos existentes, sem ativação de células progenitoras (FARBER; GERSON, 1984; PONDER¹, 1996 apud DUNCAN; DORRELL; GROMPE, 2009, p. 466-481)

Na regeneração do fígado seguida da perda de células parenquimais induzidas por outras toxinas, tais como galactosamina, a replicação e diferenciação de células progenitoras intrahepática ocorre (SHINOZUKA et al., 1978; EVARTS; NAGY; MARSDEN, 1987; LEMIRE; SHIOJIRI; FAUSTO, 1991), na dependência da natureza da injúria, doses do agente indutor ou outras variáveis experimentais (FAUSTO, 2004). Por outro lado, células originárias da medula podem gerar 20 % ou mais de células endoteliais e outras células não parenquimatosas (CNP), durante a regeneração hepática (FUJII et al., 2002).

A extensão e o tempo de regeneração do fígado variam de acordo com o ritmo circadiano – ritmos biológicos que estão vinculados ao ritmo dia-noite, grande parte dos organismos vivos apresentam ritmos circadianos (BARBASON et al., 1995). Estudo recente identificou o mecanismo pelo qual esse ritmo controla a proliferação de hepatócitos após HP (MATSUO et al., 2003; SCHIBLER, 2003).

Foi demonstrado que o pico de ADN após HP em ratos sempre ocorreu 36 horas após a cirurgia, independentemente da hora do dia em que o procedimento foi executado. A entrada de células que tivesse replicado seu ADN (células de G2) em mitose, no entanto, sempre ocorreu ao mesmo período do dia. Esta constatação sugere que um relógio circadiano controla a transição de G2/M; os autores sugerem a WEE1 quinase - são enzimas tirosina quinase que fosforilam sítios inibindo a ação das ciclinas dependentes de quinases CdKs - como uma reguladora da divisão celular (ALBERTS et al., 2002). A WEE1 – é uma quinase nuclear da família serina-treonina quinase de masa molecular de 96 KDA. A WEE1 é um componente do *checkpoint* do ciclo celular inibindo a fosforilação Cdc2 quinase nas posições tirosina 15 e 14, importante na regulação do tamanho celular. A WEE1 fosforila a Cdc2 quinase, interrompendo a atividade do complexo Cdc2/cyclin B1, que participa da mitose do hepatócito. A expressão de WEE1 segue um ciclo circadiano e a passagem de células da fase G2/M varia inversamente com níveis de WEE1 após a HP. Este estudo é consistente com estudos em Forkhead boxM1b (FoxM1b)– fator

¹ PONDER, K. P. Analysis of liver development, regeneration, and carcinogenesis by genetic marking studies. *FASEB Journal*, v. 10, p. 673–682, 1996.

de transcrição nuclear que regula a expressão da proteína p27 durante a fase S do ciclo celular – knockout (KO) ratos, que exibem um déficit na replicação de ADN após HP. FoxM1b regula a entrada na fase M através da coordenação da indução de ciclina B1 e ativação de *cdc25b* para defosforilação de Cdc (WANG et al., 2002). Estas observações sugerem que o calendário de replicação do ADN, que não está sob o controle do ritmo circadiano, parece ser uma propriedade intrínseca dos hepatócitos.

Ratos e camundongos diferem na capacidade de replicação do ADN após HP, sendo de 12 a 16 horas anterior em ratos do que em camundongos. Weglarz e Sandgren (2000) transplantaram hepatócitos de ratos em fígados de camundongos e observaram que os hepatócitos de ratos proliferam mais cedo que o de camundongos após HP. Estes resultados indicam que a replicação do ADN do hepatócito após HP é um processo autônomo, guiado por sinais intrínsecos (FAUSTO; CAMPBELL; RIELLE, 2006).

Embora todas as células hepáticas participem do processo regenerativo, a maioria dos estudos focaliza os hepatócitos. Estes constituem cerca de 90% da massa hepática e 60% do número total de células. As células endoteliais e as células de Kupffer representam 35% da população celular hepática e constituem 5-10% da massa hepática total (FAUSTO; CAMPBELL, 2003; ALISON et al., 2004; FAUSTO; CAMPBELL; RIELLE, 2006, DUNCAN; DORRELL; GROMPE, 2009).

Os hepatócitos são células de natureza epitelial vivendo aproximadamente 150 dias; portanto é rara a presença de figuras de mitose. Entretanto, quando drogas hepatotóxicas são administradas, ou uma parte do fígado é removida, os hepatócitos proliferam e o fígado regenera sua arquitetura normal e seu tamanho anterior. A regeneração hepática após a hepatectomia parcial (70%) nos ratos ocorre de 5 a 7 dias (HIGGINS; ANDERSON, 1931; BUCHER; SWAFFIELD, 1964; STOCKER; PFEIFER, 1965). Se, porém, a lesão for contínua ou se repetir com frequência, simultaneamente a regeneração, ocorre um considerável aumento de tecido conjuntivo. Essa produção exagerada de conjuntivo desorganiza a regeneração, levando o fígado a um processo patológico grave chamado cirrose, que prejudica todas as funções hepáticas. A morte dos hepatócitos é seguida pela cicatrização e embora os hepatócitos possam se regenerar e produzir uma nova população de células, suas conexões com o sistema porta e drenagem biliar são

destruídas, padrão este conhecido como cirrose (STEVENS; LOWE, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; GUERRA et al., 2009; LIU et al., 2009).

A capacidade de regeneração do fígado dos mamíferos já é conhecida há muito tempo e, no rato, após ressecção dos lobos lateral esquerdo e médio (HP), os quais representam aproximadamente 67% da massa hepática total, os lobos residuais lateral direito e caudato, deflagram uma resposta essencialmente hiperplásica com regeneração de células e tecidos que culminam, em 3 a 14 dias, na restauração do volume original do órgão (RONCO et al., 2002). No homem, a capacidade de regeneração do fígado é muito menor do que de camundongos e ratos. Apenas um hepatócito entre 20.000 pode estar se dividindo em algum momento, durante a vida adulta do ser humano ou animal, sendo que essa divisão pode ocorrer no máximo, uma ou duas ou talvez nenhuma vez. Contudo, sua capacidade de replicação não é perdida (RAMALHO et al., 1993; FAUSTO; LAIRD; WEBBER, 1995; BARATTA et al., 1996; DIEHL; RAI, 1996; FLADMARK et al., 1997).

Muitas substâncias têm sido utilizadas em animais parcialmente hepatectomizados para avaliar seu papel no processo regenerativo e no estresse oxidativo induzido pela HP, uma vez que a peroxidação lipídica é um dos fatores na gama de agentes influenciadores no fenômeno da regeneração (OK et al., 2003; TREJO-SOLÍS et al., 2003).

Biondo-Simões et al. (2007) observaram que a suplementação de glutamina à dieta após hepatectomia (HP) de 70% leva à maior replicação de hepatócitos com 24 horas, portanto é benéfica para a regeneração hepática. Furuta et al. (2000) observaram que animais submetidos à hepatectomia e pancreatômia parciais obtiveram uma menor taxa de proliferação celular, corroborando a participação destes hormônios na síntese de ADN hepático. A triiodotironina (T_3) atua como um mitógeno primário, induzindo a proliferação celular em fígados hepatectomizados. Produz um aumento significativo na capacidade proliferativa de fígados normais e em cultura de hepatócitos, promovendo também um aumento na fluidez da membrana dos hepatócitos em regeneração e estimulando a síntese de ADN *in vivo* (MALIK et al., 2003, 2005).

Ainda, os animais hepatectomizados e tratados com os FH apresentaram, após 48 horas, um aumento de 84,2% no índice de proliferação dos hepatócitos (MIRANDA et al., 2005). Dessa maneira, além dos estímulos endógenos gerados

pela hepatectomia parcial, o fígado ainda pode responder a um estímulo adicional induzido pelos FH, traduzindo-se em uma maior redução de fibras colágenas no arcabouço hepático e aumento na proliferação de hepatócitos. Para que novos hepatócitos sejam adicionados ao fígado após a hepatectomia parcial, o estroma deve ser remodelado por meio de lise da antiga matriz extracelular e síntese de uma nova matriz (MANGNALL; BIRD; MAJEED, 2003; MICHALAPOULOS, 2007).

Muitos fatores de crescimento, como o fator de crescimento hepático (HGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator transformador do crescimento (TGF), insulina, glucagon, citocinas, fator tumoral da necrose (TNF) e interleucinas (IL-1 e IL-6) têm sido aplicados para regular a capacidade proliferativa dos hepatócitos, porém os mecanismos permanecem mal compreendidos (TAUB, 2002, 2004). A interleucina-6 é uma citocina de ação pleiotrópica – células-alvo múltiplas e múltiplas ações – clonada em 1986, secretada pelas células de Kupffer que está envolvida em diversos processos inflamatórios e tumorais e na regeneração hepática (ROSE-JOHN; SCHELLER, 2006). A IL-6 possui importante função na replicação dos hepatócitos pelo aumento da produção de HGF ou pela expressão de genes envolvidos no ciclo celular (OHIRA et al., 1996; SUN et al., 2005). A IL-6 age sobre várias células, sendo liberada em quase todas as situações de alteração da homeostase, como endotoxemia, trauma e infecção aguda (MICHALAPOULOS; DEFRANCES, 1997). Em conjunto com o fator de necrose tumoral –TNF- α (*Tumor Necrosis Factor-alpha*) e interleucina-1 (IL-1) tem papel na resposta inflamatória aguda que inclui febre, liberação de corticóides e produção hepática de inibidores de proteases da fase aguda de processos inflamatórios. Independentemente de seu papel no processo inflamatório, a IL-6 induz a diferenciação e desenvolvimento de linfócitos B e T, células mielóides, megacariócitos, osteoclastos, células neurais e hepatócitos. Age também como fator de crescimento de células neoplásicas renais do sarcoma de Kaposi e de "células-tronco" do sistema hematopoiético (DRAHOTA et al., 1999). Todas estas substâncias podem ser produzidas pelo fígado quando este é submetido a alguma agressão, na tentativa de recuperar o tecido perdido e manter suas funções fisiológicas e metabólicas (FAUSTO; CAMPBELL; RIEHLE, 2006).

O complexo receptor para IL-6 consiste de uma glicoproteína ligante denominada gp80 e outra sinalizadora denominada gp130. O complexo formado ao se ligar à proteína gp80 interage, nas células-alvo, com pelo menos uma molécula

da proteína gp130 da membrana celular e desta forma desencadeia processos intracelulares de crescimento (DRAHOTA et al., 1999). O complexo receptor da IL-6 usa a tirosina quinase, cuja fosforilação ativa proteínas *STAT* (*signal transducer and activators of transcription*) do citoplasma que, ativadas, participam do controle genético ao encontrarem certos polipeptídeos extracelulares. Essas proteínas podem interagir com receptores, com a tirosina-fosfatase, outros fatores de transcrição e com a "engrenagem" envolvida nesse processo. Uma vez ativados, os complexos translocam-se para o núcleo celular onde reconhecem regiões nos genes promotores de sua ação. Estes "*sites*", em geral, encontram-se bastante próximos a "*sites*" de outros fatores de transcrição, o que sugere uma ação combinada desses fatores na regulação genética (DRAHOTA et al., 1999). Experimentos mostraram uma participação da proteína gp130 na proliferação e diferenciação celular e na regulação da apoptose. Nos hepatócitos, ela previne a apoptose induzida pelo TGF-beta (DRAHOTA et al., 1999).

A HP induz rapidamente a expressão de mais que 100 genes que normalmente não são expressos no fígado normal (TAUB, 1996, 2004). Esses genes estão relacionados direta ou indiretamente nos eventos de entrada dos hepatócitos no ciclo celular (LEU et al., 2003). Logo após hepatectomia, há elevação dos níveis de IL-6, a partir do que se observa forte ativação dos fatores *STAT3* e dos fatores nucleares para a IL-6, incrementando a transcrição dos genes-alvo. Segue-se elevação da síntese de ADN pelos hepatócitos o que pode sugerir um envolvimento desses fatores no "gatilho" para a mitogênese (transição G0/G1) dos hepatócitos após hepatectomia (DRAHOTA et al., 1999).

Há indícios de que IL-6 protege o fígado contra lesões de isquemia e promove proliferação de hepatócitos após reperfusão (KNOPP et al., 1997). A oncostatina, uma proteína da família da IL-6 induz a maturação de hepatócitos fetais quando combinada com glicocorticóides. Recentes estudos indicam que TNF- α e IL-6 apresentam importante papel na sinalização para o início dos eventos que levam à regeneração, os quais não se processam normalmente sem essas duas substâncias sendo essencial a presença da IL-6 (DRAHOTA et al., 1999). Igualmente não há ativação das proteínas *STAT3* sem a presença do TNF- α (MICHALOPOULOS; DEFRANCES, 1997). Porém, o processo regenerativo pode ocasionalmente ocorrer por completo em ratos deficientes de IL-6 (STARZL et al., 1977).

O papel preciso da IL-6 na regeneração hepática é complexo, uma vez que cerca de 40% dos genes expressos no início da regeneração (SU et al., 2002; PUSTOVRH et al., 2005) são dependentes de IL-6. A função primária da IL-6 na regeneração foi originalmente proliferativa, como ratos KO – nocaute para a IL-6 tinha um surpreendente déficit na replicação do ADN após HP, dados subseqüentes mostraram que a IL-6 também possui atividade anti-apoptótica e de sobrevivência de hepatócitos (SAKAMOTO et al., 1979; WALLENIUS et al., 2001; BLINDENBACHER et al., 2003; WUESTEFELD et al., 2003; KLEIN et al., 2005). Além disso, os níveis de IL-6 apresentam-se após HP críticos na determinação de seus efeitos (BLINDENBACHER et al., 2003; ZIMMERS et al., 2003).

O fator de célula-tronco (SCF) – com atividade constante durante o ciclo celular e dependente da fosforilação da proteína-alvo – é uma citocina expressa por diversos tipos celulares que se liga a seu receptor c-kit, uma tirosina quinase expressa em todas as CTHs. Apesar da SCF não ser essencial para geração de CTHs, estudos têm demonstrado que a sinalização SCF/c-kit previne a apoptose destas células aumentando a chance de expansão (HASSAN; ZANDER, 1996). O SCF e oncostatin M (OSM) são duas moléculas que podem modular ou aumentar os efeitos da IL-6 durante a regeneração hepática. SCF restaura a replicação do ADN em ratos IL-6 KO, após HP (REN et al., 2003) e a administração de OSM pode corrigir a regeneração deficiente vista em ratos IL-6 KO, após injúria induzida pelo CCl₄ (NAKAMURA et al., 2004). Por outro lado, IL-6 não é capaz de restaurar a regeneração defeituosa após CCl₄, que é vista em ratos deficientes para o receptor OSM. Os efeitos destas citocinas são pelo menos em parte redundantes, como IL-6, SCF e OSM podem ativar todos *STAT3* (da família de transdutores-de-sinal-e-ativadores-de-transcrição (STATs, predominantemente STAT-3). Desempenham importantes funções nas células normais, tais como: resposta imune, diferenciação celular, inflamação, proliferação, regeneração e apoptose, em resposta a diversos fatores como IL-6, HGF, FGF entre outros). Alguns componentes da família *STAT* também interferem na carcinogênese em hepatócito, mas suas vias de sinalização intracelular divergem em algum momento para explicar suas diferenças aparentes na atividade biológica.

Em razão da ativação de citocinas no início da regeneração hepática é importante identificar os mecanismos que desencadeiam a ativação desta via de sinalização. Provavelmente, o LPS que é liberado de bactérias entéricas, por

exemplo, na circulação portal é o responsável por esse efeito (CORNELL, 1985, 1990). Outros componentes do sistema imune inato parecem ser críticos para a regeneração normal, pois ratos deficientes nos componentes C3 e C5 do sistema complemento exibem défices significativos após HP. Nestes animais, a menor ativação das vias de sinalização da citocina é manifestada pela ausência de aumento nos níveis de TNF e IL-6 e atividade de NF- κ B e STAT3 (STREY et al., 2003).

A via da citocina atua na fase de iniciação da regeneração hepática que corresponde à passagem de hepatócitos quiescentes no ciclo celular (G0 para G1). A progressão do ciclo celular, em seguida, é orientada por fatores de crescimento (são moléculas peptídicas extracelulares), que se ligam a um receptor de superfície, disparando uma via de sinalização intracelular que leva à proliferação, diferenciação ou outra resposta celular - que substituem um ponto de restrição tardia na fase G1. A passagem do G1 para fase S está associada à fosforilação de Rb, expressão aumentada de p107 membro da família de Rb e de ciclinas D, E e A e a formação de complexos de cdk2/D e cdk4/E (ALBRECHT et al., 1993, 1998; MENJO; IKEDA; NAKANISHI, 1998).

HGF e a família do ligante do receptor EGF (EGFR) são importantes fatores de crescimento que impulsionam a progressão do ciclo celular, durante a regeneração do fígado (MATSUMOTO; NAKAMURA, 1992; MICHALOPOULOS; KHAN, 2005). HGF é produzido por células mesenquimais e atua em hepatócitos de modo parácrino ou endócrino. Seus efeitos são múltiplos e tem sido agrupado em categorias: morfogênico, motogênico e mitogênico. Estudos de regeneração hepática de camundongos com deleção de c-met – o gene para o receptor de HGF – foi recentemente realizado (BOROWIAK et al., 2004; HUH et al., 2004). Borowiak et al. (2004) demonstraram que a sinalização de HGF/c-met é essencial para a entrada ciclo celular após HP e que é responsável pelo sinal de ativação extracelular regulado por quinase (ERK). Em contrapartida, Huh et al. (2004) relataram que hepatócitos de camundongos KO para c-met apresentaram mortalidade maciça após HP. Estes autores concluíram que a sinalização HGF/c-met é importante na hepatoproteção contra apoptose e facilita o reparo após a administração de CCl₄. A discrepância na sobrevivência pós operatória entre estes dois relatos provavelmente está relacionado às diferentes técnicas cirúrgicas utilizadas pelos grupos, como observado por Borowiak et al. (2004) até dados adicionais disponibilizados, decidir

se a sinalização de HGF/c-met funciona principalmente na mitogênese, ou se mantém a homeostase do hepatócito e, assim, facilita a replicação da célula.

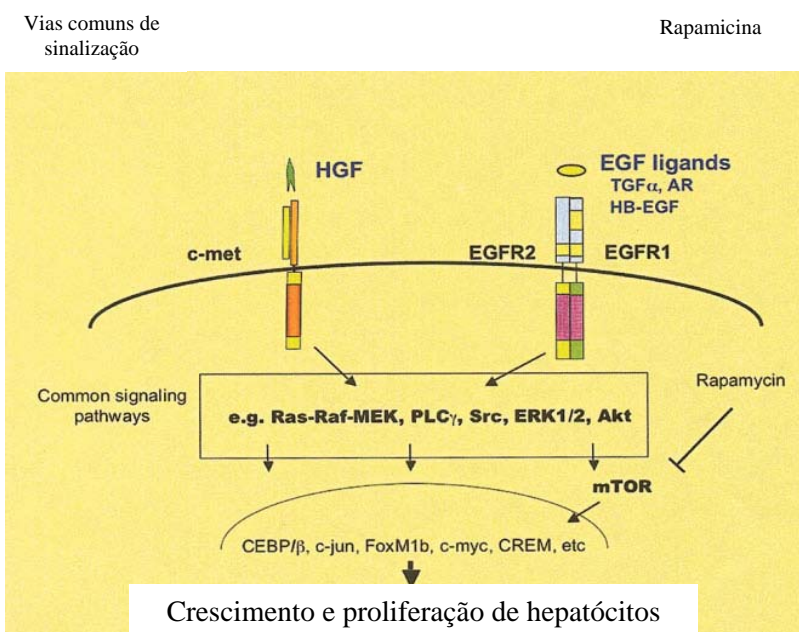
EGF é um fator trófico pertencente a uma família de fatores de crescimento estruturalmente relacionados, denominada família EGF. Possuem estrutura similar, ligam-se aos mesmos receptores, têm efeitos similares, porém não idênticos (SKOV OLSEN et al., 1988). A esta família pertence o EGF, o Fator de Crescimento e de Transformação α (TGF α), a anfirregulina (AR, também conhecida como fator de crescimento derivado de Schwannoma), o EGF ligado à Heparina (HBEGF), a betacelulina (BTC), a epirregulina (EPR) e a heregulina ou neuregulina (também conhecida como fator de diferenciação Neu) (ROWINSKY, 2004; CHEN et al., 2007). No fígado é formado nos hepatócitos em regeneração, havendo alta concentração de receptores na membrana celular e no núcleo das células. Sua produção é maior na zona I (periportal), onde a regeneração é mais ativa (SHERLOCK; DOOLEY, 1997).

O suprimento de EGF para o fígado é feito continuamente pelas glândulas de Brünner do duodeno, através da circulação portal (SKOV OLSEN et al., 1988). Age sinergicamente com a insulina, aumentando a síntese de ADN o EGF (das glândulas de Brünner e do duodeno) IL-6, hormônios tireoideanos, insulina, (HASHIMOTO et al., 1998) e possivelmente interage com o IGF-1 no processo de crescimento hepático (BOR et al., 2000). Para manifestar este efeito, depende da integridade de várias vias sinalizadoras, que incluem norepinefrina (MICHALOPOULOS; DEFRANCES, 1997). Há indícios de que, no fígado, possa inibir os fenômenos de apoptose (ROBERTS; JAMES; COSULICH, 2000).

Agindo em conjunto com HGF e IGF possivelmente faça um papel de ligação entre os hormônios ovarianos estrógeno e progesterona e seus tecidos-alvo (WOODWARD; XIE; HASLAM, 1998), podendo estimular a migração e divisão de células epiteliais por aumento da síntese de proteínas como a fibronectina que participa da ligação intercelular (NISHIDA et al., 1984). A família de receptores que ligam o EGF, além de EGF, inclui TGF α , EGF fator de crescimento semelhante ligado a heparina (HB-EGF) e anfirregulina (AR). TGF α é um fator de crescimento autócrino, ambos produzidos por hepatócitos ativos. Embora TGF α tenha efeitos sobre a motilidade celular e vascularização, seu principal efeito é o estímulo da proliferação celular (MEAD; FAUSTO, 1989).

Anfiregulina (AR) parece também contribuir para a regeneração, pois camundongos KO para este fator de crescimento apresentam um déficit importante na replicação do ADN após HP (BERASAIN et al., 2005; MICHALOPOULOS; KHAN, 2005). Comparações diretas entre AR e outros receptores de EGF não foram realizadas, mas é provável que os diferentes fatores de crescimento apresentem funções independentes, mas parcialmente sobrepostas na regeneração de fígado.

A complexa sinalização de EGFR após HP é provavelmente devida ao número de receptores de EGF envolvidos, sua especificidade para o receptor de diferentes heterodímeros, e a subsequente ativação de vias de sinalização intracelular (CARVER et al., 2002; MICHALOPOULOS; KHAN, 2005). Ambos c-met e o EGFR são receptores tirosina quinase, que recrutam enzimas e proteínas para fosforilar domínios intracelular de cada receptor. Assim várias vias de sinalização intracelular são ativadas, que regulam os múltiplos fatores de transcrição, iniciam a tradução e regulam vias metabólicas (Figura 7).



Fonte: FAUSTO; CAMPBELL; RIEHLE, (2006).

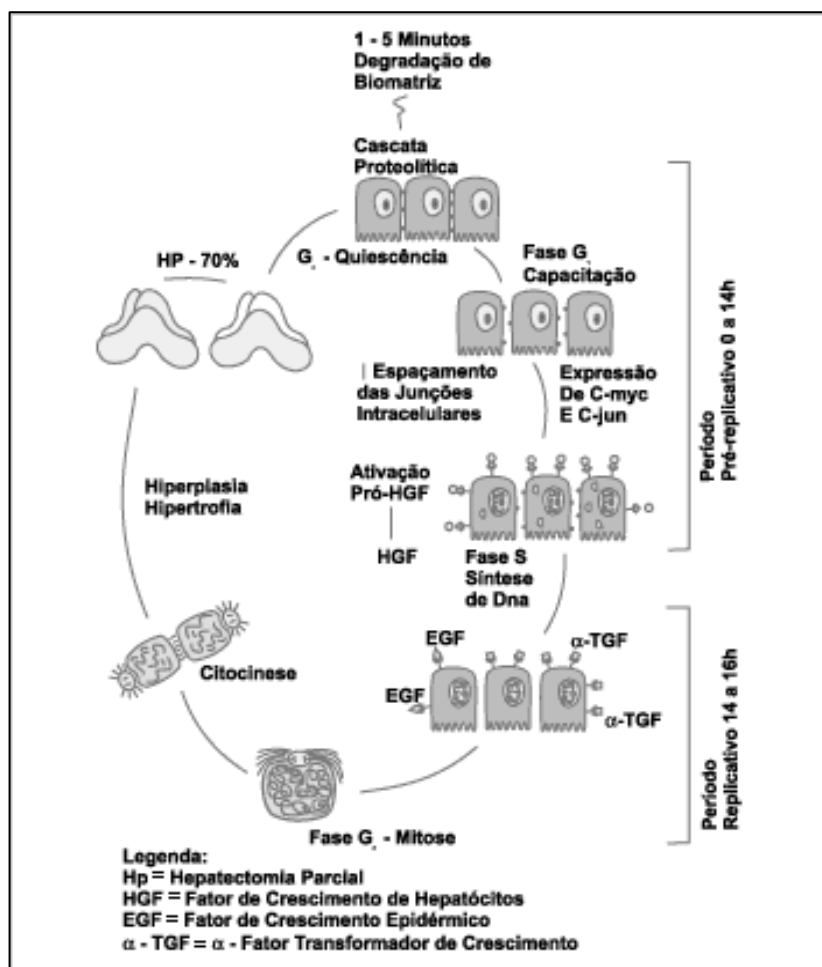
Figura 7- Vias de sinalização de fatores de crescimento durante a regeneração do fígado. Estimulação dos receptores tirosina quinase para HGF (c-met) e dos ligantes de EGF, TGF α , HB-EGF e o AR, (EGFR) ativa numerosas vias de sinalização intracelular que regulam os fatores de transcrição envolvidos na regeneração do fígado. HGF, fator de crescimento de hepatócitos; EGF, fator de crescimento epidérmico, TGF α , fator transformador de crescimento alfa; HB-EGF fator de crescimento epidérmico ligado a heparina, AR, anfiregulina; mTOR, receptor mamífero de rapamicina

Uma via de transdução de sinais mitogênicos é de especial interesse, porque poderia integrar vias de sinalização de citocinas assim como de fatores de crescimento, é a cascata RAS-RAF-MEK, que resulta na ativação da ERK1/2. A ativação de ERK1/2 está correlacionada com replicação do ADN do hepatócito *in vivo* e a proliferação do hepatócito *in vitro* (TALARMIN et al., 1999; COUTANT et al., 2002; LI et al., 2002; THORESEN; GUREN; CHRISTOFFERSEN, 2003).

Fatores de crescimento, como HGF e TGF α e citocinas como IL-6 e o TNF estimulam a atividade de ERK1/2 em hepatócitos primários e em linhagem celular de hepatócitos (FRANCAVILLA et al., 1986, SCHEVING et al., 2002; ARGAST et al., 2004).

Uma família de ligantes de receptor nuclear, incluindo a Tiroxina, 1, 2-bis [2-(3.5-dichloropyridyloxy)] benzeno (TCPOBOP), e o ácido retinóico, parece ser o principal mitógeno de hepatócitos *in vivo*, capaz de induzir a replicação sem perda de tecido. TCPOBOP, que liga o receptor constitutivo de androstane (CAR), demonstrou estimular a síntese de ADN dos hepatócitos independente de várias moléculas que são essenciais para regeneração após HP, incluindo TNF, IL-6, NF- κ B, STAT3 e ciclina D1 (LEDDA-COLUMBANO et al., 1998; LEDDA-COLUMBANO et al., 2002). No entanto, as vias pelas quais a ativação de CAR direciona a replicação de hepatócitos permanecem ainda indefinidas.

A regeneração hepática após HP é uma resposta perfeitamente sincronizada cujo processo de iniciação é requisito do organismo para a função hepática. Identificar mecanismos moleculares que influenciam a capacidade do fígado modular seu crescimento, de acordo com as necessidades de todo o organismo é complexo. No entanto, o aumento da demanda metabólica imposta sobre o fígado remanescente após HP está associado com a ativação da maquinaria celular (FAUSTO; CAMPBELL; RIEHLE, 2006) (Figura 8).



Fonte: JESUS; WAITZBERG; CAMPOS, (2000).

Figura 8 - Processo de regeneração hepática pós hepatectomia parcial experimental

A administração de uma mistura de aminoácidos para ratos normais induz uma onda de replicação de hepatócitos e a deprivação de proteínas bloqueia a regeneração do fígado após HP (MCGOWAN ATRYZEK; FAUSTO, 1979; MEAD et al., 1990). Estudos têm mostrado que os aminoácidos regulam a proliferação de hepatócitos através da expressão de ciclina D1 (NELSEN et al., 2003). O início da tradução da proteína é um ponto de controle crítico que poderia integrar níveis de energia e nutrientes com sinais mitogênicos (MARTIN; BLENIS, 2002). Após HP, a atividade da proteína p70 S6 quinase aumenta e a ativação 4E-BP1 (um repressor transducional) diminui, levando a um aumento de transdução. Ambas proteínas que operam na sinalização do mTOR (receptor alvo da rapamicina de mamíferos), que é parte de um complexo que detecta o nutriente ou *status* energético e também integra

sinais de fator de crescimento, resultando na regulação da tradução de proteínas e crescimento celular (KIM; SABATINI, 2004; AVRUCH et al., 2005).

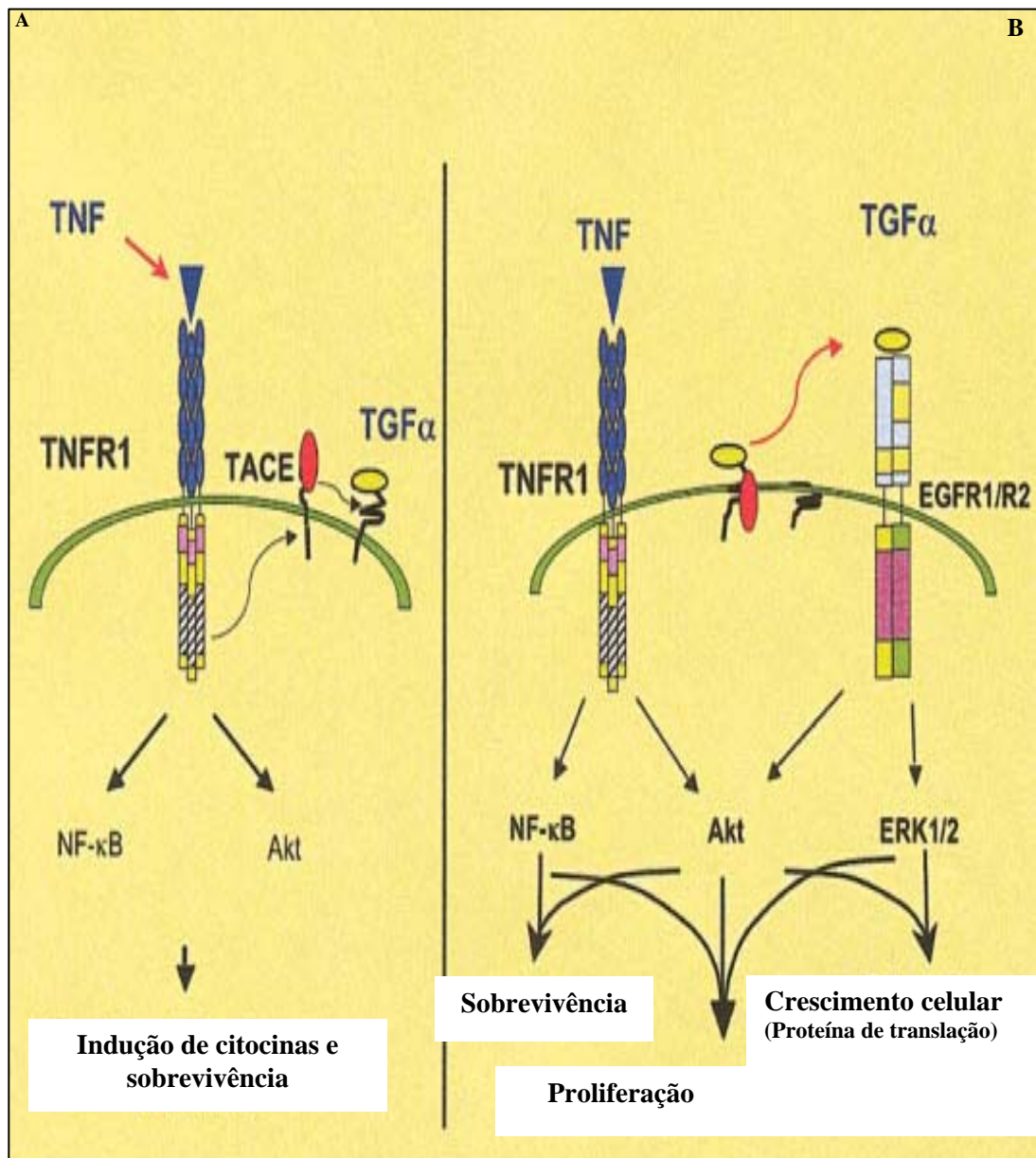
A importância da tradução na regeneração hepática foi ilustrada por um estudo de HP em camundongos S6 KO, em que foi demonstrada uma perda total da replicação do DNA do hepatócito (VOLAREVIC et al., 2000). O complexo de mTOR pode regular a regeneração do fígado através de uma modulação do crescimento celular e a proliferação em resposta às demandas de energia do fígado remanescente, uma vez que a rapamicina, um inibidor de mTOR, inibe a replicação do ADN após HP (VOLAREVIC et al., 2000; JIANG; BALLOU; LIN, 2001; GOGGIN et al., 2004).

Portanto, se a regeneração hepática representa um desafio para esse complexo, porque mecanismos de detecção de nutrientes em células de mamíferos parecem modular o crescimento celular, na dependência da disponibilidade de nutrientes. Após HP o fígado precisa regular a homeostase sistêmica de nutrientes, enquanto suas próprias células encontram-se sobre crescimento celular e proliferação (FAUSTO; CAMPBELL; RIEHLE, 2006).

Fatores de crescimento, citocinas e vias metabólicas ativas após HP interagem durante diferentes fases da regeneração do fígado. Uma ligação importante entre citocinas e fatores de crescimento pode ser a ativação das metaloproteases (MMPs) por citocinas, tais como TNF. A atividade dos vários MMPs aumenta após HP, (RUDOLPH et al., 1999; KIM et al., 2000) e estudos recentes em camundongos KO para o metaloproteases 3 tecidual (TIMP3). TIMP3 é considerado um inibidor específico de TACE, além disso, Timp3 exibido em camundongos KO mostrou níveis elevados de proteína hepática TNF e uma entrada anterior em fase S, após HP. No entanto, 144 horas após a HP, uma proporção de animais morreram, possivelmente devido à perda da regulação das vias de sinalização de TNF. Fausto, Campbell e Riehle (2006) demonstraram que o próprio TNF pode ativar TACE, resultando na liberação do TGF α , ativação de receptores EGFR e a proliferação celular de hepatócitos in vitro (ARGAST et al., 2004). A ativação sequencial de receptores de citocinas e de fatores de crescimento pode estimular numerosas vias de sinalização intracelular necessárias para a sobrevivência e proliferação celular (Figura 9). TACE demonstrou se decompor em formas precursoras de citocinas e de vários ligantes de EGFR, incluindo HB-EGF, AR e TGF (LEE et al., 2003). Em estudos da proliferação de hepatócito sem co-

cultura com células epiteliais, Serandour et al. (2005) revelaram que EGF por si só não inicia a replicação do hepatócito, mas a exposição do sistema a EGF e TNF induz a replicação em até 30 % dos hepatócitos. Os autores demonstram que o efeito principal da TNF é ativar MMPs, que posteriormente degradam componentes da matriz extracelular, permitindo a proliferação de hepatócitos. EGF e TNF foram capazes de induzir repetidas ondas de replicação de hepatócitos se administrado ao longo de vários ciclos de 10 dias, como exemplificado na figura 9. Estes resultados são uma extensão importante dos dados mencionados na figura 9.

A proliferação celular que é induzida por fatores de crescimento ou citocinas pode ocorrer apenas na presença de diferentes sinais de sobrevivência. As células que recebem o sinal proliferativo na ausência de sinal de sobrevivência não proliferam, ao contrário, morrem por um processo chamado apoptose (BIRKENKAMP; COFFER, 2003), que se caracteriza por alterações morfológicas distintas que incluem: perda de volume celular e condensação da cromatina (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). Assim, a apoptose age como um importante mecanismo para eliminação de células que sofreram mutações durante o ciclo celular e que podem resultar em uma proliferação celular descontrolada (BIRKENKAMP; COFFER, 2003).



Fonte: FAUSTO, CAMPBELL, RIEHLE, (2006).

Figura 9 - Mecanismo para ativação de EGFR através da atividade TACE (enzima de conversão do fator de necrose tumoral α , também denominado ADAM 17). A ligação de TNF ao seu receptor ativa NF- κ B e AKT, estimulando a produção de citocinas e sobrevivência (A). TNF também ativa TACE, que cliva TGF α ligado à membrana. A molécula TGF α clivada, ativa e vincula o EGFR - um receptor tirosina quinase - levando a ativação de ERK1/2 (B). Cooperação entre citocina (TNF) e fator de crescimento (EGF ligante) ativa via de sinalização que são necessárias para a sobrevivência de hepatócito, crescimento e proliferação. EGFR, receptor de fator de crescimento epidérmico; TACE, enzima de conversão do fator de necrose tumoral α , também denominado ADAM 17); NF- κ B, fator nuclear-kappaB; TNF, fator de necrose tumoral; TGF α , fator transformador de crescimento alfa; ERK1/2, sinal extracelular-regulado por quinase 1/2

Uma lacuna importante no nosso conhecimento é a falta de compreensão dos fatores que determinam se a produção de hepatócitos durante os diversos processos regenerativos se origina da replicação de hepatócitos maduros, como na regeneração do fígado após HP, ou a diferenciação de células progenitoras do

fígado como ocorre após necrose hepática maciça. Além disso, é fundamental conhecer o papel do sistema imune inato e de células linfóides no início desses processos. Grandes avanços da genética e manipulação de camundongos tornam possível a construção de modelos animais apropriados para estudar problemas não resolvidos de grande importância biológica e clínica envolvendo os aspectos moleculares e celulares do fígado em regeneração (FAUSTO; CAMPBELL; RIEHLE, 2006).

O mecanismo de regeneração é controlado pelo fator de transformação de crescimento α , fator de transformação de crescimento β , fator de crescimento da epiderme, interleucina-6 e fator de crescimento dos hepatócitos. Muitos desses fatores são liberados pelas células estreladas armazenadoras de gordura (células de Ito) situadas no espaço de Disse, embora, também exista fator de crescimento dos hepatócitos ligado à heparina na escassa matriz extracelular do fígado. Na maioria dos casos, a capacidade de replicação dos hepatócitos restantes é responsável pela regeneração; entretanto, quando a lesão hepatotóxica é demasiadamente grande, a regeneração do fígado ocorre pela atividade mitótica das células progenitoras ovais dos colangíolos e dos canais de Hering (SHINOZUKA et al., 1978; RAMALHO et al., 1993; ALISON et al., 1996; PONDER, 1996; RAMALHO et al., 1998; THEISE; SAXENA; PORTMANN, 1999; GARTNER; HIAT, 2003).

Destas observações é geralmente aceito, que a regeneração hepática é um fenômeno bem orquestrado, regulado por sinais do organismo que exercem efeitos modulatórios (positivos ou negativos) no fígado até que seu tamanho ideal seja alcançado (ANKOMA-SEY, 1999; FAUSTO; CAMPBELL; RIEHLE, 2006).

A regeneração do fígado após a hepatectomia parcial é mediada pela proliferação de células maduras do fígado que restauram o tecido hepático perdido (PONDER, 1996). Nestas células do fígado estão incluídas hepatócitos, células endoteliais, células epiteliais biliares, células estreladas hepáticas e células de Kupffer. Ao contrário das outras regenerações de tecido semelhante a da pele ou medula óssea, no fígado, as células progenitoras ou as células tronco não participam ativamente da capacidade regenerativa. Das células do fígado, os hepatócitos são as primeiras a proliferar e são os mais importantes para a regeneração parenquimal. Após a perda de algum tecido ou em algum ferimento, os hepatócitos entram no ciclo celular (G0 - quiescente). Para um estado pré-replicativo (G1), que é seguido pela síntese de ADN (S) e mitose (M) com a divisão celular

completando a seqüência. A fase pré-replicativa do ciclo pode ser dividida em dois componentes, um estágio *priming* (G0 – G1) e um estágio *progression* (ANKOMASEY, 1999).

Na última década, foi observado um aumento de interesse nos mecanismos de regeneração do fígado, gerados a partir de uma ciência biológica e um ponto de vista clínico. Pesquisadores perceberam que a regeneração do fígado constitui um modelo exclusivo para estudar o sinal de eventos de transdução e ciclo celular de forma sincronizada *in vivo*. Do ponto de vista clínico, noções básicas sobre o mecanismo de regeneração do fígado é crucial para o adequado gerenciamento e o desenvolvimento de novas terapias para um número de condições importantes, tais como insuficiência aguda do fígado e cirrose (FAUSTO; CAMPBELL; RIEHLE, 2006).

Não obstante várias décadas de estudo, os fatores reguladores que desencadeiam e/ou modulam o fenômeno regenerativo hepático estão sendo apenas inicialmente compreendidos. Diversos avanços foram obtidos na elucidação dos mecanismos envolvidos neste fenômeno pelo estudo do crescimento controlado de hepatócitos em meios de cultura e das alterações no padrão da expressão gênica após a hepatectomia parcial. Os efeitos dos fatores hepatotróficos na síntese de ADN têm sido geralmente estudados *in vitro*, em culturas de hepatócitos; e *in vivo*, em animais normais ou parcialmente hepatectomizados. Em culturas primárias de hepatócitos, geralmente os fatores são testados não por seu efeito direto na síntese de ADN, mas principalmente por sua habilidade em elevar ou inibir a replicação de ADN induzida pelo EGF (FAUSTO, 1990; FAUSTO; CAMPBELL; RIEHLE, 2006).

A pesquisa de fatores de crescimento hepático na regeneração hepática deve levar em conta os seguintes aspectos:

- ✓ nenhum fator único é suficiente para regular todo processo regenerativo – fatores positivos e negativos podem estimular e inibir a proliferação de hepatócitos. A relação entre estes fatores pode ser mais importante que seus níveis absolutos;
- ✓ o local de síntese destes fatores pode ser o fígado ou outros tecidos. No fígado, tanto células parenquimatosas como não parenquimatosas podem sintetizar e liberar estes fatores; e
- ✓ a presença de fatores de crescimento hepático – HGF no soro de animais parcialmente hepatectomizados não necessariamente implica que tais fatores

sejam responsáveis pelo desencadeamento do processo regenerativo (FAUSTO; THOMPSON; BRAUN, 1987; BRAUN et al., 1988; FAUSTO; MEAD, 1989; MEAD; FAUSTO, 1989; RAMALHO et al., 1998).

A resposta celular aos vários fatores de crescimento exige a presença de receptores específicos na membrana plasmática dos hepatócitos. Após a interação do fator de crescimento ao seu receptor na superfície celular, uma complexa cascata de eventos se sucede que sinalizam vias de ativação e inibição por segundos mensageiros (FAUSTO; CAMPBELL; RIEHLE, 2006).

3.3.1 Tipos de Fatores de Crescimento do Fígado

Michalopoulos (1990) classificou esses agentes em dois grupos: os mitogênicos completos e os incompletos (co-mitogênicos). Entre os agentes mitogênicos completos tem-se: a) o fator de crescimento epidêmico (EGF); b) fator de crescimento do hepatócito (HGF); c) o fator transformador do crescimento alfa (TGF- α); d) a substância estimuladora hepática (HSS); e) o fator de crescimento de fibroblastos ácido (FGF- α) e f) o hormônio do crescimento. Entre os co-mitogênicos tem-se: a) norepinefrina – hormônio não peptídeo – e receptor adrenérgico, b) vasopressina e angiotensinas, c) insulina e glucagon, d) prostaglandinas (ácido araquidônico, PGA1, PGE1, PGE2 e PGE2 α), e) estrógeno e testosterona e f) fibronectina.

Como fatores de crescimento hepático pode-se incluir um grande número de substâncias parcialmente caracterizadas, assim como diversos fatores amplamente conhecidos. Os fatores de crescimento já bem conhecidos podem ser subdivididos em 3 categorias: agentes mitogênicos ou indutores do crescimento; agentes co-mitogênicos; e agentes inibidores do crescimento (RAMALHO et al., 1993,1998; GORLA JUNIOR et al., 2001).

3.3.1.1 Agentes mitogênicos

São substâncias capazes de, por si própria, em meios de cultura isentos de soro ou de qualquer outro fator mitogênico, induzir síntese de ADN e mitose numa

população de hepatócitos - fase G0 (MICHALOPOULOS, 1990; RAMALHO et al., 1998; ANKOMASEY, 1999).

3.3.1.1.1 Fator de Crescimento Epidérmico (EGF – Epidermal Growth Factor)

É o protótipo de um fator mitogênico, estimulando a síntese de ADN na maioria das células epiteliais, inclusive em hepatócitos. Foi a primeira substância em que este efeito foi confirmado, sendo frequentemente mais usado para induzir a síntese de ADN em cultura primária de hepatócitos. Induz a incorporação de timidina tritiada por 60-80% dos hepatócitos em meio de cultura. É potencializado pela insulina e pelo glucagon, *in vitro* e *in vivo*. Seu efeito sobre a síntese de ADN é utilizado como modelo, contra o qual é comparada a atividade de outros fatores de crescimento hepático. O EGF é produzido nas glândulas salivares, glândulas de Brunner do duodeno, rins e pâncreas. A ressecção das glândulas de Brunner resulta em redução do processo regenerativo, enquanto a sialoadenectomia não alterou a regeneração (MCGOWAN; STRAIN; BUCHER, 1981; ST. HILAIRE; JONES, 1982; OLSEN et al., 1988; MARTI; BURWEN; JONES, 1989; GUPTA; AZAN; BAQUER, 1990; RAMALHO et al., 1998).

Quando o EGF é adicionado em cultura de hepatócitos, a síntese de ADN não ocorre antes de 24 horas, sendo o pico atingido entre 48 e 72 horas. A diferença observada em relação à síntese de ADN após a hepatectomia parcial pode refletir o tempo para adaptação dos hepatócitos ao ambiente *in vitro*. A adição de EGF 24 horas após o isolamento dos hepatócitos resulta em resposta rápida e imediata. A estimulação pelo EGF geralmente conduz a 2-3 ciclos de síntese de ADN, após os quais há interrupção por razões ainda desconhecidas. A atividade mitogênica do EGF é inibida pelo TGF- β (HOUCK; LUTHERER, 1981; CHAN; KOST; MICHALOPOULOS, 1989; RAMALHO et al., 1998).

3.3.1.1.2 Fator Transformador do Crescimento-alfa (TGF α – Transforming Growth Factor- α)

Descrito originalmente como um fator produzido por células tumorais, o TGF α é também sintetizado por tecidos normais *in vivo* e por células em cultura. Visto que

o TGF α e EGF atuam sobre o mesmo receptor, não é surpreendente que o TGF α seja também mitogênico para hepatócitos, sendo equipotentes em sua capacidade de estimular a proliferação de hepatócitos *in vitro*. São peptídeos semelhantes, apresentando homologia em cerca de 30-40% de sua estrutura aminoacídica. A atividade mitogênica do TGF α é também inibida pelo TGF- β (LUETTEKE et al., 1988; BRENNER; KOCH; LEFFERT, 1989; MEAD; FAUSTO, 1989; PANDIELLA; MASSAGNE, 1991; RAMALHO et al., 1998).

É sintetizado por hepatócitos em regeneração, mas não por células não parenquimatosas, observando-se elevação nos níveis do RNAm para TGF α nas primeiras 4-5 horas após a hepatectomia parcial, com um pico (cerca de 10 vezes o normal), 24 horas após a hepatectomia parcial. Os níveis de TGF α se elevam em 8 horas após a hepatectomia parcial. Obtendo-se um pico de 24 horas e outro de 72 horas após a hepatectomia parcial. Em cultura de hepatócitos, também se verifica elevação dos níveis do RNAm e da secreção de TGF α durante a síntese de DNA (MEAD; FAUSTO, 1989; RAMALHO et al., 1998). É secretado pelas células de Kupffer (MICHALOPOULOS; DEFRANCES, 1997) e por uma variedade de células normais incluindo macrófagos, eosinófilos, hepatócitos, ceratinócitos, células gastrientestinais, cerebrais e placentárias (SKOV OLSEN et al., 1988).

A secreção de TGF α por hepatócitos em regeneração possivelmente se constitui uma alça autócrina estimuladora da síntese de ADN. Nesse sentido, a produção de TGF α não seria responsável pelo desencadeamento do processo regenerativo, mas corresponderia a um passo fundamental em direção à síntese de ADN, no qual o TGF α atuaria sobre um hepatócito já "iniciado", após ter deixado o estado quiescente (fase G0) e iniciando o evento de entrada nas fases do ciclo celular (fase G1) (MICHALOPOULOS, 1990; RAMALHO et al., 1998).

3.3.1.1.3 *Fator de Crescimento Fibroblastos Ácido (aFGF – acidic Fibroblast Growth Factor)*

Também chamado de Fator de Crescimento Ligante à Heparina 1 (*Heparin Binding Growth Factor 1*), é secretado por hepatócitos em regeneração, com pico de secreção coincidindo com o pico de síntese de ADN. Estimula a síntese de ADN em hepatócitos; parecendo, entretanto atuar em populações específicas de hepatócitos, visto que apenas metade das células responde ao aFGF. Sua produção persiste por

7 dias após a hepatectomia parcial. É também produzido por células não parenquimatosas no fígado (células ovais - células tronco precursora de hepatócitos - e células de Ito) (KAN et al., 1989; MARSDEN et al., 1992; RAMALHO et al., 1998).

O aFGF reduz o efeito inibitório do TGF- β sobre a mitogênese induzida pelo EGF. Ao se comparar com o EGF, verifica-se que sua atividade mitogênica é consideravelmente menor. A heparina potencializa a atividade biológica do aFGF (KAN et al., 1989; GUPTA; AZAN; BAQUER, 1990; RAMALHO et al., 1998).

3.3.1.1.4 *Fator de Crescimento Hepático (HGF – Hepatocyte Growth Factor)*

É o mais importante mitógeno para hepatócitos normais. É mitogênico em cultura de hepatócitos humanos e de ratos. Seu efeito é inibido pela somatostatina, parcialmente inibido pela heparina e exacerbado pela norepinefrina. Glicocorticóides e TGF- β reduzem a secreção de HGF. O receptor para o HGF é codificado pelo proto-oncogene c-MET, o qual é diferente do receptor para o EGF (MICHALOPOULOS et al., 1984; LINDROOS; ZARNEGAR; MICHALOPOULOS, 1991; MICHALOPOULOS; ZARNEGAR, 1992; ZARNEGAR; MICHALOPOULOS, 1989; RAMALHO et al., 1998).

Zhang et al. (2006) demonstraram que a perfusão de fatores hepatotróficos (FH) exógenos como fator de crescimento de hepatócito – *HGF* e *HGF* acrescido de insulina pela veia porta pode aliviar a lesão hepática, minimizar o dano ultraestrutural do hepatócito, proteger a função hepática e diminuir a fibrose hepática em ratos com hipertensão portal após *shunt* (desvio) portocaval. Sabendo-se que animais desnutridos apresentam um retardo no processo regenerativo (SKULLMAN et al., 1994), a suplementação nutricional torna-se uma estratégia terapêutica de grande potencial clínico. O HGF no fígado é produzido predominantemente por células estreladas hepáticas (SCHIRMACHER et al., 1993), mas também por células endoteliais hepáticas (LECOUTER et al., 2003). As células de Ito conhecidas como células estreladas perissinusoidais, estão envolvidas na regulação da matriz hepática e síntese de uma série de fatores de crescimento, entre as quais HGF, TGF α e TGF- β . Sua presença em vários tecidos envolvidos na circulação portal sugere que o efeito trófico para o fígado pode ser exibido pelo HGF oriundo de sítios

extra-hepáticos. O HGF induz a síntese de ADN em hepatócitos, quando injetado na veia porta de cães (FRANCAVILLA et al., 1991c; GUPTA; AZAN; BAQUER, 1990; MICHALOPOULOS, 1992; SCHIRMACHER et al., 1992; MICHALOPOULOS; ZARNEGAR, 1992; RAMALHO, 1998).

Os níveis plasmáticos de HGF elevam-se substancialmente (mais de 20 vezes) dentro de 1 hora após a hepatectomia parcial em ratos e em humanos. Isso faz do HGF o principal candidato à função desencadeadora do processo regenerativo, após a hepatectomia parcial. Sua elevação em 1 hora é condizente com as alterações na expressão gênica, detectadas 30 minutos após a hepatectomia parcial. O mecanismo para essa indução extra-hepática do RNAm do HGF após a hepatectomia parcial ainda é desconhecido. O HGF exerce um efeito mitogênico nos hepatócitos de maneira parácrina e endócrina (MICHALOPOULOS, 1990; MICHALOPOULOS; ZARNEGAR, 1992; RAMALHO et al., 1998; ANKOMASEY, 1999; LECOATER et al., 2003).

3.3.1.2 Agentes Co-mitogênicos

Este grupo é composto por substâncias que estimulam a proliferação do hepatócito de uma maneira indireta. Apresentam as seguintes propriedades (RAMALHO et al., 1993,1998; ANKOMASEY, 1999):

- ✓ potenciam o efeito mitogênico dos indutores do crescimento (por exemplo EGF, HGF, TGF α);
- ✓ reduzem o efeito inibitório de agentes inibidores; e
- ✓ não possuem efeito mitogênico quando isoladamente adicionados em meios de cultura.

3.3.1.2.1 *Substância Estimuladora Hepática (HSS – Hepatic Stimulatory Substance)*

Isolada originalmente de fígado de ratos recém-desmamados, existem ainda controvérsias acerca da purificação e caracterização da HSS. Substâncias similares foram isoladas de fígados de cães, de porcos e do fígado fetal humano. Uma peculiaridade do HSS é sua aparente especificidade para o fígado, tanto *in vivo*

como *in vitro* (LABRECQUE; PESCH, 1975; LABRECQUE, 1991; GUPTA; AZAN; BAQUER, 1990; RAMALHO et al., 1998).

In vitro, embora diversos autores tenham reportado efeito mitogênico da HSS para hepatócitos em cultura, foi demonstrada a necessidade da adição de EGF à cultura de hepatócitos para o desencadeamento da resposta proliferativa. A adição simultânea do HSS e EGF à cultura de hepatócitos causa um incremento na síntese hepatocelular de DNA quando se compara ao efeito isolado do EGF (FLEIG; HOSS, 1989; RAMALHO et al., 1998).

In vivo, sua capacidade de estimular a síntese de DNA torna-se detectável a partir de 12 horas, após a hepatectomia parcial, atinge o pico em 26 horas após a cirurgia (quando a síntese de DNA é 4 vezes mais intensa), e persiste por cerca de 72 horas, sendo indetectável após 8 dias (LABRECQUE; PESCH, 1975; LABRECQUE, 1991; RAMALHO et al., 1998).

3.3.1.2.2 Norepinefrina e Receptor $\alpha 1$ Adrenérgico

É um receptor essencial durante as fases iniciais da regeneração hepática. Seu bloqueio com prazosin (bloqueador seletivo para os receptores $\alpha 1$ adrenérgicos) abole o pico de síntese de ADN observado 24 horas após a hepatectomia parcial. Efeitos semelhantes foram obtidos com fígados desnervados. A administração de β -bloqueadores (propranolol - bloqueador seletivo para os receptores $\beta 1$ adrenérgicos), também deprime o pico de síntese de DNA após a hepatectomia parcial e suprime a regeneração hepática (MACMANUS et al., 1973; CRUISE; HOUCK; MICHALOPOULOS, 1985; CRUISE et al., 1987; RAMALHO et al., 1998).

Em cultura de hepatócitos, a norepinefrina possui suas propriedades mediadas pelo receptor $\alpha 1$ adrenérgico: não é mitogênica sozinha, exacerba o potencial mitogênico do EGF; e é capaz de reduzir o efeito inibitório do TGF- β (CRUISE; COLECCHIA; MICHALOPOULOS, 1986; HOUCK; MICHALOPOULOS, 1989; RAMALHO et al., 1998).

O receptor $\alpha 1$ adrenérgico é o principal regulador da via glicogenolítica. Sua estimulação desencadeia a quebra do fosfatidil inositol, com aumento dos níveis citoplasmáticos de diacilglicerol e inositol trifosfato. Estas moléculas medeiam uma cascata de eventos intracelulares de cálcio. Quando os hepatócitos em regeneração

são mais sensíveis à norepinefrina (cerca de 10 a 20 horas após a hepatectomia parcial), o receptor α_1 adrenérgico ainda não está acoplado à via do fosfatidil inositol (CRUISE et al., 1988; EXTON, 1988; RAMALHO et al., 1998).

3.3.1.2.3 *Vasopressina e Angiotensinas II e III*

Em linhagens de ratos KO para a vasopressina, a regeneração hepática encontra-se atenuada, sendo restabelecida após infusão do hormônio (RUSSELL et al., 1983; RAMALHO et al., 1998).

A vasopressina é secretada em sinapses simpáticas no fígado juntamente com a norepinefrina. Portanto, ambas as substâncias podem estar envolvidas nos efeitos do sistema simpático sobre a regeneração hepática (MICHALOPOULOS, 1990; RAMALHO et al., 1998).

3.3.1.2.4 *Insulina e Glucagon*

A insulina e o glucagon são hormônios importantes para o trofismo e metabolismo dos hepatócitos. O fígado recebe pela veia porta toda a insulina produzida pelo pâncreas endócrino e é o único órgão parenquimatoso nos seres humanos que tem uma capacidade substancial de regenerar após a ressecção do ferimento. Esta característica original tem despertado por muito tempo o interesse dos investigadores e progressos significativos têm sido feitos nos últimos anos para a compreensão de alguns dos fatores que controlam a regeneração hepática nos animais.

O diabetes – deficiência de insulina ou a resistência insulínica– causa uma grave esteatohepatite que pode levar à cirrose. O *shunt* porto cava – desvio do fluxo da veia porta para a veia cava caudal – força a insulina a desviar-se do fígado, provocando atrofia de cerca de 1/3 de seu tamanho (BUCHER, 1976). A administração de insulina diretamente no fígado de animais com *shunt* porto cava reverte a atrofia hepática e está associado com a rápida proliferação do fígado, entretanto a insulina não é um mitógeno direto para hepatócitos. Hepatócitos em cultura apresentam uma resposta diminuída aos mitógenos na ausência de insulina,

provocando a degeneração e a morte destas células (CRUISE; HOUCK; MICHALOPOULOS, 1985). A insulina é um regulador importante na função do hepatócito em todos os períodos e está envolvida na adaptação metabólica que os hepatócitos necessitam para prover as funções homeostáticas durante a regeneração. Baseado nessas observações, estudos clínicos têm surgido utilizando a insulina e o glucagon no tratamento de doenças do fígado humano (BAKER, 1985).

O glucagon é um hormônio peptídico que estimula a síntese de proteínas hepáticas e atua sinergicamente com a insulina na regeneração hepática. Entre suas ações, ele eleva os níveis de glicemia, promove a gliconeogênese e glicogenólise hepática, por ativação da adenilciclase na membrana dos hepatócitos, desencadeando reações que terminam por ativar a fosforilase, que degrada o glicogênio em glicose a qual, após desfosforilação, é liberada para a circulação. Esse efeito é tão intenso que, sua infusão contínua pode causar hiperglicemia mesmo quando esgotado todo o glicogênio hepático. O glucagon aumenta a extração de aminoácidos do sangue pelos hepatócitos aumentando a quantidade de substrato para a conversão em glicose (GUYTON; HALL, 2002). Outros efeitos do glucagon incluem a ativação da lipase, com aumento da disponibilidade de ácidos-graxos e inibição de seu armazenamento pelo fígado, aumento da força cardíaca, aumento da secreção biliar e inibição da secreção ácida gástrica (GUYTON; HALL, 2002; LEHNINGER, NELSON; COX, 2002).

Estudos dos fatores hormonais envolvidos na regeneração do fígado mostram que a elevação da síntese de ADN é menor com o EGF isoladamente e pode ser aumentada pela adição de glucagon ou insulina. A ação do EGF também pode ser avaliada pela incorporação de timidina em hepatócitos. Esses dois hormônios, embora potentes promotores falham na iniciação da proliferação dos hepatócitos nos animais com fígado sadio, o que sugere a necessidade de adicionar outros fatores, provavelmente derivados de órgãos esplâncnicos não-portal (BUCHER; PATEL; COHEN, 1977).

O glucagon estimula a síntese de proteínas hepáticas e atua sinergicamente com a insulina na regeneração hepática. A ausência de insulina provoca a degeneração e a morte destas células em meio de cultura. Na presença de uma relativa deficiência de insulina no fígado, o fígado atrofia. Porém, injeções de insulina

têm mostrado a reversão ou prevenção da atrofia hepática sob estas condições (ANKOMA-SEY, 1999; JESUS; WAITZBERG; CAMPOS, 2000).

A insulina, glucagon e EGF são prováveis reguladores da regeneração hepática em animais. Evidências substanciais sugerem que pelo menos 6 substâncias estão envolvidas no controle da regeneração hepática nos animais. Estas evidências surgiram das investigações dos modelos de regeneração hepática usando animais sadios, frequentemente com confirmação no sistema de cultura de hepatócitos. Insulina, glucagon e EGF têm recebido a maioria dos estudos nesta consideração. Estudos demonstraram que o sangue venoso portal é necessário para a manutenção do tamanho do fígado e para uma regeneração normal em resposta à ressecção hepática. Os fatores humorais no sangue portal, possivelmente a insulina e o glucagon, podem ser importantes na regulação da regeneração hepática, mas tal estudo não exclui a possibilidade de outras substâncias poderem estar envolvidas neste processo. O glucagon, como a insulina, tem efeito isolado discreto, mas, aumenta a resposta quando é associado ao EGF (MCGOWAN; STRAIN; BUCHER, 1981; BAKER, 1985).

A síntese hepatocelular de ADN, após a hepatectomia parcial pode ser inibida pela infusão de anticorpos anti-insulina, enquanto a infusão de insulina, glucagon e EGF induzem aumento na síntese hepática de ADN em animais “sadios”. A evisceração e a pancreatectomia resultam em severa redução da síntese de ADN após a hepatectomia parcial, e a administração de insulina e glucagon revertem completamente este efeito. O trofismo hepático está reduzido em animais com diabetes induzidos pela aloxana (substância química que provoca lesões irreversíveis nas células beta pancreáticas, as quais deixam de produzir a insulina, tornando o organismo diabético (ELLIOTT; EWCHAND; ALTMANN, 1997). A concentração de insulina na veia porta diminui rapidamente após a hepatectomia parcial, enquanto os níveis de glucagon aumentam (BUCHER; SWAFFIELD, 1964; BUCHER; PATER; COHEN, 1978; STARZL et al., 1978; CASTRO E SILVA et al., 1987; RAMALHO, 1998).

O glucagon é um hormônio peptídico com efeitos opostos aos da insulina. Entre suas ações, ele eleva os níveis de glicemia, promove a gliconeogênese e glicogenólise hepática, por ativação da adenil-ciclase na membrana dos hepatócitos, desencadeando reações que terminam por ativar a fosforilase, que degrada o glicogênio em glicose a qual, após desfosforilação, é liberada para a circulação

(GUYTON; HALL, 2002). Esse efeito é tão intenso que, sua infusão contínua pode causar hiperglicemia mesmo quando esgotado todo o glicogênio hepático. O glucagon aumenta a extração de aminoácidos do sangue pelos hepatócitos aumentando a quantidade de substrato para a conversão em glicose (GUYTON; HALL, 2002).

Estudos dos fatores hormonais envolvidos na regeneração do fígado mostram que a elevação da síntese de DNA é menor com o EGF isoladamente e pode ser aumentada pela adição de glucagon ou insulina. A ação do EGF também pode ser avaliada pela incorporação de timidina em hepatócitos. Esses dois hormônios, embora potentes promotores falham na iniciação da proliferação dos hepatócitos nos animais com fígado sadio, o que sugere a necessidade de adicionar outros fatores, provavelmente derivados de órgãos esplâncnicos não-portal (BUCHER; PATER; COHEN, 1977).

A insulina, glucagon e EGF são prováveis reguladores da regeneração hepática em animais. Evidências substanciais sugerem que pelo menos 6 substâncias estão envolvidas no controle da regeneração hepática nos animais. Estas evidências surgiram das investigações dos modelos de regeneração hepática usando animais sadios, frequentemente com confirmação no sistema de cultura de hepatócitos. Insulina, glucagon e EGF têm recebido a maioria dos estudos nesta consideração. Estudos demonstraram que o sangue venoso portal é necessário para a manutenção do tamanho do fígado e para uma regeneração normal em resposta à ressecção hepática. Os fatores humorais no sangue portal, possivelmente a insulina e o glucagon, podem ser importantes na regulação da regeneração hepática, mas tal estudo não exclui a possibilidade de outras substâncias poderem estar envolvidas neste processo. O glucagon, como a insulina, tem efeito isolado discreto, mas, além disso, aumenta a resposta quando é associado ao EGF (MCGOWAN; STRAIN; BUCHER, 1981; BAKER, 1985).

A síntese hepatocelular de DNA, após a hepatectomia parcial pode ser inibida pela infusão de anticorpos antiinsulina, enquanto a infusão de insulina, glucagon e EGF induzem aumento na síntese hepática de ADN em animais “sadios”. A evisceração e a pancreatectomia resultam em severa redução da síntese de DNA após a hepatectomia parcial, e a administração de insulina e glucagon revertem completamente este efeito. O trofismo hepático está reduzido em animais com diabetes induzidos pela aloxana (substância química que provoca lesões

irreversíveis nas células betas pancreáticas, as quais deixam de produzir a insulina, tornando o organismo diabético (ELLIOTT; EWCHAND; ALTMANN, 1997). A concentração de insulina na veia porta diminui rapidamente após a hepatectomia parcial, enquanto os níveis de glucagon aumentam (BUCHER; SWAFFIELD, 1964; BUCHER; PATER; COHEN, 1978; STARZL et al., 1978; CASTRO E SILVA et al., 1987; RAMALHO et al., 1998).

Não obstante as fortes evidências de que a insulina e o glucagon exerçam papel permissivo para a síntese hepatocelular de ADN e para o processo regenerativo hepático, não há evidências de que estas substâncias apresentem qualquer efeito mitogênico sobre o fígado (MICHALOPOULOS, 1990; RAMALHO et al., 1998).

3.3.1.2.5 *Estrógenos e Progesterona*

Evidências substanciais admitem a influência dos estrógenos na regeneração hepática (NI; YAGER, 1994). Após a hepatectomia parcial, seus níveis séricos encontram-se elevados, atingindo um pico de 24 a 48 horas. Os receptores estrogênicos encontram-se aumentados após a hepatectomia parcial, assim como o tempo de retenção nuclear dos mesmos. Ao contrário, os níveis de testosterona estão reduzidos após a hepatectomia parcial, assim como os receptores nucleares para andrógenos. O tamoxifen – modulador seletivo do receptor de estrógeno oral que é utilizado no tratamento do câncer de mama – bloqueia a síntese hepática de ADN se precocemente disponível após a hepatectomia parcial (FRANCAVILLA et al., 1986; FRANCAVILLA et al., 1989a,b; RAMALHO et al., 1998).

Os estrógenos induzem o incremento na mitogênese quando adicionados a cultura de hepatócitos contendo EGF ou soro. Em animais sadios, o etinilestradiol (estrogênio mais freqüente dos contraceptivos orais combinados desde a primeira geração das pílulas) atua como promotor de carcinogênese hepática (FRANCAVILLA et al., 1989b; SHI; YAGER, 1989; RAMALHO et al., 1998).

Em homens, os níveis séricos de estradiol elevam-se rapidamente, com um pico 48 horas após a ressecção hepática, enquanto os níveis de testosterona diminuem. Em mulheres, no entanto, nenhuma alteração significativa foi observada

nos níveis de estradiol e testosterona após a ressecção hepática (SVANAS et al., 1989; FRANCAVILLA et al., 1990; RAMALHO et al., 1998).

Hipogonadismo e feminilização são comumente encontrados em pacientes cirróticos devido ao aumento da atividade estrogênica. Tais alterações são decorrentes, em parte, da queda na metabolização de esteróides pelo fígado. Os hormônios esteróides são conjugados no fígado a fim de se tornarem mais polares (hidrossolúveis), para que sejam excretados pela urina ou pela bile. Entretanto, outros fatores elevam os níveis de estrógenos séricos nos cirróticos, como a diminuição da produção hepática de globulinas carreadoras de hormônios sexuais (TOTH; THOMAS, 1992). Assim, o fígado normal, além de metabolizar e, por vezes, excretar os hormônios esteróides, ele ainda é responsável pela regulação do transporte e biodisponibilização aos tecidos desses hormônios. Colesterol (C) e triglicerídeos não circulam sozinhos no sangue, são transportados por lipoproteínas carreadoras, divididas em quatro classes: quilomícrons e lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), de densidade baixa (LDL) e de alta densidade HDL (ETTINGER; FELDMAN, 1997). O estrógeno age no metabolismo lipídico aumentando o catabolismo e a depuração do LDL nos hepatócitos por aumento do número de receptores e redução dos receptores de HDL nos hepatócitos, diminuindo seu catabolismo. Essa ação possibilita uma circulação maior do HDL, considerado colesterol “bom”, que tem função de retirar colesterol dos vasos e tecidos (FARISH et al., 1993; VAN BERESTEIJN et al., 1993; KAMALI et al., 2000). O fígado desempenha relevante função no metabolismo dos hormônios tireoidianos, os quais, por sua vez, são também fundamentais para o funcionamento desse órgão e o metabolismo das bilirrubinas (HUANG; LIAW, 1995). O hormônio tireoidiano (HT) tem influência na função hepática. Os hepatócitos são células altamente responsivas ao HT e têm a maioria dos seus receptores para TSH localizados intranuclear (OPPENHEIMER; SCHWARTZ; SURKS, 1974). O HT modula a atividade de várias organelas dentro dos hepatócitos, destacando-se a sua ação nas mitocôndrias, onde age aumentando o consumo de oxigênio e a fosforilação oxidativa (HORST; ROKOS; SEITZ, 1989; LIVERIN; IOSSA; BARLETTA, 1992).

Na maioria dos pacientes com hipertireoidismo, a ocorrência de disfunção hepática se dá em virtude dos efeitos metabólicos do excesso de HT e da hipóxia tecidual, que ocorre como resultado do aumento de consumo de oxigênio

esplâncnico e do aumento da demanda de oxigênio hepático (BAYRAKTAR; VAN THIEL, 1997).

3.3.1.2.6 Agentes Imunossupressores

Trabalhos evidenciaram que a ciclosporina e a FK506, dois potentes imunossupressores, são capazes de estimular a proliferação hepatocelular em ratos submetidos à hepatectomia parcial. Resultados semelhantes foram obtidos em cães. Ao contrário dos experimentos “*in vivo*” a adição de ciclosporina e FK506 à cultura de hepatócitos não resultou em qualquer efeito sobre a replicação celular (FRANCAVILLA et al., 1991a,b; RAMALHO et al., 1998). Atualmente, a Ciclosporina-A (CsA) e o Tacrolimus (FK506), são drogas amplamente utilizadas nos protocolos terapêuticos imunossupressores (GARCIA et al., 2004; TAYLOR; WATSON; BRADLEY, 2005; ZHAO; DUNCAN, 2005). Paralelamente, também são utilizadas no tratamento de doenças auto-imunes, como artrite reumatóide, psoríase e líquen plano (KOVARIK et al., 2003; SANCHEZ; SHERIDAN; ROGERS, 2004) assim como no tratamento dos retinoblastomas (ECKSTEIN et al., 2005).

Ambas as drogas atuam na via de sinalização de cálcio, inibindo a calcineurina e o fator nuclear de células T ativadas (NFATc), primeiro sinal para ativação dos linfócitos T helper e linfócito T citotóxico (FOXWELL; WOERLY; RYFFEL, 1990; PLOSKER; FOSTER, 2000), bem como a síntese de interleucina-2 (IL-2), receptor de IL-2, interferon gama (INF- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (BADER; LEIEUNE; MESSNER, 1998; OETTINGER-BARAK et al., 2001).

O efeito destas substâncias é mediado por sua interação a uma nova família de proteínas citosólicas denominadas imunofilinas, as quais são específicas para cada agente imunossupressor (FRANCAVILLA et al., 1993; RAMALHO et al., 1998).

O papel dos imunossupressores na regeneração hepática vem sendo confirmado por outra série de experimentos utilizando rapamicina (agente imunossupressor com atividade comprovada na inibição dos sinais intracelulares originados pelo acoplamento de IL-2 com seu receptor de membrana). Mais do que a inibição da ativação de linfócitos-T, estudos recentes elevam a rapamicina à categoria de um potencial agente antitumoral. Estruturalmente similar e possuindo a mesma proteína citosólica de ligação que a FK506, a rapamicina tem efeito negativo

sobre a proliferação hepática. Inibe a replicação dos hepatócitos em meios de cultura, a síntese de ADN e a proliferação hepatocelular, após a hepatectomia parcial, e ainda a síntese de ADN no intestino delgado remanescente após nefrectomia unilateral; (FRANCAVILLA et al., 1991b; RAMALHO et al., 1998).

Estes resultados indicam que as imunofilinas podem influenciar a regeneração hepática tanto de forma estimulatória quanto inibitória. Indicam ainda uma possível existência de substâncias endógenas análogas à ciclosporina, FK506 e rapamicina, as quais podem constituir um elo de ligação entre o sistema imune e o sistema de controle do crescimento celular (FRANCAVILLA et al., 1993; RAMALHO et al., 1998).

3.3.1.2.7 *Prostaglandinas*

Lípídeos são substâncias hidrofóbicas. Os principais lípídeos são: triacilglicerídeos e ácidos graxos, fosfolípídeos, esteróides, prostaglandinas e ceras. São encontrados em todos os tecidos, mas principalmente nas membranas celulares e nas células de gordura. Prostaglandinas são lípídios que não desempenham funções estruturais, mas são importantes componentes em vários processos metabólicos e de comunicação intercelular. A substância chave na biossíntese das prostaglandinas é o ácido araquidônico, que é formado através da remoção enzimática de hidrogênios do ácido linoléico. O ácido araquidônico é convertido a prostaglandina pela ação da enzima ciclooxigenase, que adiciona oxigênios e promove sua ciclização. No organismo, o ácido araquidônico é estocado sob a forma de fosfolípídios, em membranas. Sob certos estímulos, o ácido é liberado do lípídio de estocagem (através da ação da enzima fosfolipase A2) e rapidamente convertido a prostaglandinas, que iniciam o processo inflamatório (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

A cortisona tem ação antiinflamatória por bloquear a ação da fosfolipase A2. Este é o mecanismo de ação da maior parte dos antiinflamatórios esteróides. Existem outras rotas onde o ácido araquidônico é transformado em prostaglandinas, algumas envolvem a formação de um intermediário, o ácido 5-hidroperoxy-6,8,11-eicosatetranóico (5-HPETE) que é formado pela ação da 5-lipoxigenase. Anti-inflamatórios não esteróides, como a aspirina®, impedem a formação das

prostaglandinas bloqueando a 5-lipoxigenase, evitando assim o processo inflamatório.

A adição de ácido araquidônico ou prostaglandinas à cultura de hepatócitos induz aumento na síntese de ADN. Semelhantemente, o tratamento de animais cirróticos com prostaglandina E2 aumenta a síntese hepática de ADN 24 horas após a hepatectomia parcial. Foi demonstrado que células de Kupffer de fígados em regeneração possuem elevada capacidade de secreção de prostaglandina E2. O aumento na secreção de prostaglandina E2 por células de Kupffer ocorre precocemente e persiste por até 48 horas após a hepatectomia parcial (ADDREIS; WHITFIELD; ARMATO, 1981; CALLERY; MANGINO; FLYE, 1990; URAKAWA et al., 1990; RAMALHO et al., 1998).

Observou-se, ainda, a inibição da síntese de ADN por drogas bloqueadoras da síntese de prostaglandinas, por exemplo, a indometacina (agente antiinflamatório não esteróide (NSAID) que inibe a enzima ciclooxigenase necessária para a formação de prostaglandinas) sugerindo importante participação das prostaglandinas no processo regenerativo hepático. Entretanto, o mecanismo pelo qual as prostaglandinas influenciam a regeneração hepática ainda não está claro (KWON et al., 1990; RAMALHO et al., 1998; MICHALOPOULOS, 2007).

3.3.1.3 Agentes Inibidores do Crescimento

Estas substâncias foram definidas em culturas primárias de hepatócitos, baseado em suas capacidades em inibir a mitogênese induzida pelo EGF.

3.3.1.3.1 *Fator Transformador do Crescimento – beta (TGF- β – Transforming Growth Factor- β)*

Provavelmente é o mais potente inibidor da proliferação dos hepatócitos e, durante a regeneração, sua expressão é forte nas células não parenquimatosas (FAUSTO et al., 1986; SHERLOCK; DOOLEY, 1997). Trata-se de uma família de proteínas que se distingue pela habilidade de inibir reversivelmente um grande número de diferentes tipos celulares, particularmente células derivadas da

ectoderme como queratinócitos e leucócitos, com fraca ação mitogênica sobre células derivadas do mesoderma, como os fibroblastos. Também é sintetizado por diferentes tipos celulares, incluindo plaquetas, macrófagos, linfócitos, fibroblastos, osteócitos e queratinócitos e no fígado, pelas células de Ito (MICHALOPOULOS; DEFRANCES, 1997; MICHALOPOULOS, 2007).

Foram identificadas três frações: TGF- β 1, 2 e 3. Suas ações são similares, mas não idênticas. As mais importantes, no que se refere ao reparo de tecidos, são a quimiotaxia de células inflamatórias e a síntese de matriz extracelular, sugerindo um importante papel regulador na cicatrização de tecidos (MICHALOPOULOS; DEFRANCES, 1997; MICHALOPOULOS, 2007).

O TGF- β 1, assim como o TGF- α , é capaz de estimular reversivelmente o crescimento de fibroblastos normais em cultura (MICHALOPOULOS; DEFRANCES, 1997), parecendo prevenir a progressão da fibrose e facilitar a proliferação dos hepatócitos durante a regeneração (NAKAMURA et al., 2000).

Está associado a uma série de funções *in vivo*, incluindo a de induzir a proliferação de células mesenquimais e de participar do processo de cicatrização de feridas. Em células epiteliais, incluindo hepatócitos, o TGF- β é, ao contrário, um potente inibidor do crescimento. Em cultura de hepatócitos, inibe a mitogênese induzida pelo EGF, pelo TGF α e pelo HGF. Existem fortes evidências de que seja inibidor da síntese de ADN na regeneração hepática *in vivo*. A injeção de TGF- β , antes e após a hepatectomia parcial, inibe o pico de síntese de ADN que ocorre 24 horas após a cirurgia. Se utilizado em doses elevadas, a síntese de ADN é completamente inibida. O mecanismo pelo qual exerce seu efeito inibitório é ainda desconhecido (GOUSTIN et al., 1986; ROBERTS et al., 1988; SPORN; ROBERTS, 1988; FAUSTO, 1991; RAMALHO et al., 1998). O TGF- α inibe, enquanto o EGF estimula a captura de aminoácidos em culturas de hepatócitos (SHERLOCK; DOOLEY, 1997).

O RNAm do TGF- β é encontrado nas células de Ito e em células endoteliais, mas não em hepatócitos de fígados em regeneração ou de fígados normais. Isto sugere que o TGF- β funcione como um efetor de um circuito inibitório parácrino. Este circuito estaria ativado durante regeneração hepática, talvez para prevenir uma proliferação incontrolada dos hepatócitos (BRAUN et al., 1988; MEAD; FAUSTO, 1989; RAMALHO et al., 1998).

3.3.1.3.2 *Interleucina 1 β*

As funções biológicas da IL-1 β são muito similares às do TNF α . É capaz de inibir a proliferação de hepatócitos. O grau de inibição da síntese de ADN não é completa como no caso do TGF- β , permanecendo um nível residual de cerca de 20% de síntese (NAKAMURA; ARAKAKI; ICHIHARA, 1988; RAMALHO et al., 1998).

Menor capacidade inibitória foi também observada com IL-6. Esta molécula é conhecida por sua intensa atividade no fígado, redirecionando a síntese protéica em direção a síntese de proteínas da fase aguda. Seu efeito na síntese de ADN reflete um reprogramamento “orquestrado” na expressão gênica, no qual a síntese de proteínas da fase aguda passa a preceder os processos de síntese que conduzem à replicação do hepatócito (NAKAMURA; ARAKAKI; ICHIHARA, 1988; RAMALHO et al., 1998).

3.3.1.3.3 *Fatores de Crescimento Parcialmente Caracterizados*

Nesse grupo estão incluídas substâncias isoladas de plaquetas de animais parcialmente hepatectomizados e de animais “sadios”, de fígados em regeneração e de fígados de ratos recém-nascidos, e do soro e do plasma de pacientes com necrose hepática fulminante. Com exceção de um fator inibitório extraído de plaquetas, todas estas preparações estimulam a replicação de ADN em hepatócitos *in vivo*, e *in vitro* após indução por EGF. Entretanto, elevadas quantidades dos mesmos componentes geralmente inibem a síntese de ADN (FAUSTO, 1990; RAMALHO et al., 1998).

Parece certo que plaquetas contêm fatores que estimulam e que inibem a síntese de ADN em hepatócitos em cultura. Visto que, *in vivo*, hepatócitos não entram em contato direto com plaquetas, não se conhece como estes fatores se interagem com os hepatócitos (FAUSTO, 1990; RAMALHO et al., 1998).

3.4 TRATAMENTO DO FÍGADO

A glicose é usada como fonte principal de energia no fígado doente, mas sua contribuição à regeneração compensatória do fígado ainda não está esclarecida. É

um substrato energético predominante na regeneração do fígado após a hepatectomia e que o deslocamento para utilização da gordura somente ocorre quando a glicose não está disponível em quantidade suficiente. Se a reparação do tecido hepático pode ser estimulada por alguns mecanismos compatíveis terapeuticamente, então eles podem possivelmente prevenir a morte da grande massa hepática doente. No complemento para a manipulação nutricional, deve ser possível explorar os mecanismos moleculares que regulam a divisão organizada das células (reparação do tecido) para aumentar a taxa de sobrevivência dos pacientes que sofrem com doenças hepáticas. Estas decisões têm um impacto significativo na reparação dos tecidos de uma variedade de outros órgãos e tecidos, particularmente nas condições da diabetes (CHANDA; MEHENDALE, 1996)

O aumento na quantidade de insulina usada em ratos tratados com solução hepatotrófica comparados com experimentos de Parra et al. (1992) – 12,5 U versus 5 U/ 100mL de solução – mostrou uma indução a resposta hiperplásica hepática similar à resposta obtida por Parra et al. (1994).

Em experimentos realizados com moléculas da MEC como na resposta da fibronectina à regeneração do fígado após a hepatectomia parcial mostraram que a fibronectina plasmática é útil para marcar a detecção da regeneração do fígado. Os níveis de fibronectina plasmáticas são bem correlacionadas com a porcentagem de mudança do peso do fígado, durante a regeneração em ratos cirróticos ou não cirróticos (KWON et al., 1990).

Tem sido demonstrado que a massa hepática tem relação de 2,5% a 3% de proporcionalidade com o peso do corpo (FURTADO, 1964; BUCHER; PATER; COHEN, 1977; VAN THIEL et al., 1987; PARRA, 1988; PARRA et al., 1994).

A relação fígado/peso do corpo tende a se manter estável através de um processo de multiplicação celular conhecida como regeneração que é ativada quando o órgão perde parte de sua massa devido a razões cirúrgicas (hepatectomia) ou patológicas (necrose). Porém, os mecanismos de controle deste processo ainda não foram completamente elucidados. Eles envolvem modificações na expressão de vários genes e o aparecimento de RNAm e suas respectivas moléculas de proteínas que representam vários outros fatores tendo uma outra ação estimulatória tais como fator de crescimento do hepatócito (HGF) e fator transformador do crescimento- α (TGF- α) ou uma ação inibitória neste processo tais como fator transformador do

crescimento- β (-TGF β) (MICHALOPOULOS, 1992; RAMALHO et al., 1993; PARRA et al., 1995).

Em termos práticos há um consenso da aceitação geral da existência de um equilíbrio, entre o tamanho do fígado e o fornecimento de fatores hepatotróficos esplâncnico, estudos têm relatado que este equilíbrio pode ser quebrado pela suplementação exógena com alguns fatores hepatotróficos conhecidos, destacando um aumento do tamanho do fígado (não hepatectomizado) além do tamanho biologicamente pré-determinado (PARRA et al., 1992, 1994, 1995).

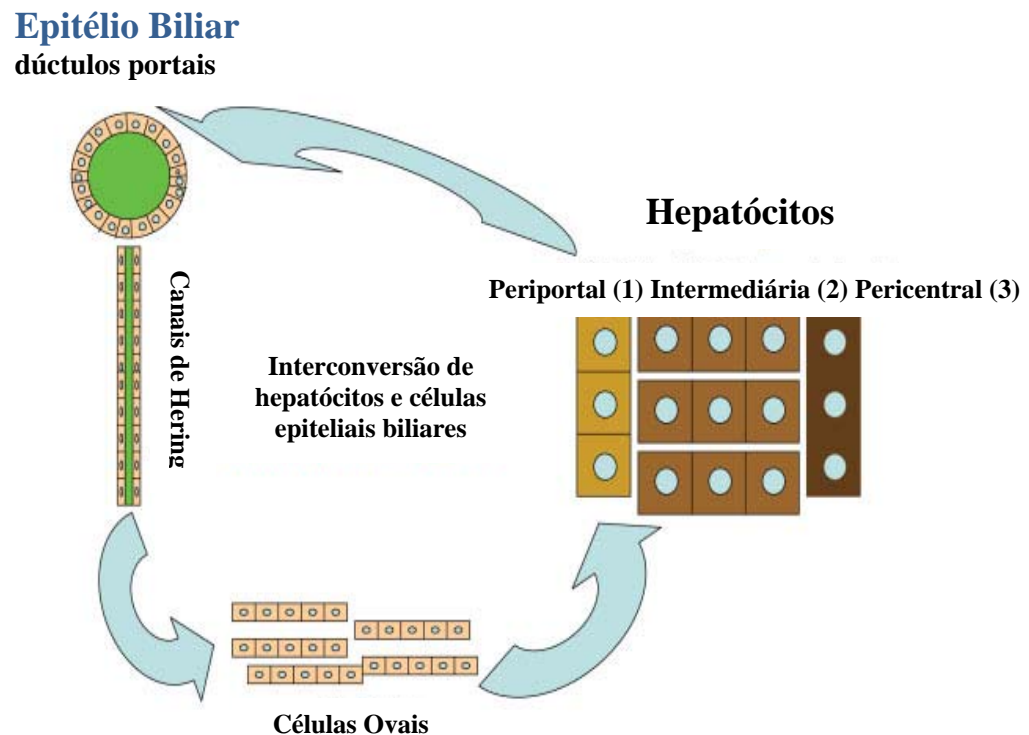
O desenvolvimento do fígado (não-hepatectomizado) sadio por estimulação de fatores exógenos tem sido demonstrado nos estudos anteriores e tem sido atribuído um mecanismo regenerativo envolvendo um aumento do número de hepatócitos. A maior dificuldade do estudo do aumento do tamanho do fígado nos experimentos no qual o tamanho estimado é comparado à massa observada é determinar o tamanho estimado nos animais vivos. Isso é feito indiretamente pela relação peso do fígado/peso do corpo no grupo controle de animais. Este procedimento também estipula o cálculo do crescimento do fígado para o peso final do corpo, um fato que elimina a possível influência no tratamento com glicose, aminoácidos e hormônios nas variações do apetite do animal, consumo de alimento e taxa de crescimento do corpo (PARRA et al., 1994, 1995).

Em fígados “sadios”, a síntese de ADN, embora infrequente, também tende a se limitar às imediações do espaço porta. Essa região denominada compartimento proliferativo, representa a porção do ácino hepático responsável pela geração de novas células. Após sua origem, os novos hepatócitos se movem em direção à veia centrolobular, de forma que as células jovens tendem a se localizar no terço interno; e as mais velhas, no terço externo do ácino hepático. Cada ponto dessa trajetória representa uma nova fase na vida do hepatócito, sendo que, em cada fase, o hepatócito encontra-se engajado numa atividade metabólica diferente (ex: glicogênese das células jovens e glicólise das células “idosas”). Embora a região mitogênica do fígado pareça se limitar às mediações do espaço porta, quando a lesão hepática é seletiva para uma determinada zona de ácino hepático, a proliferação celular torna-se mais intensa nessa região. O bromobenzeno, por exemplo, determina injúria seletiva aos hepatócitos da zona 3, observando-se, em resposta, uma maior atividade regenerativa das células circunjacentes à veia

centrolobular (NOSTRANT et al., 1978; GUMUCIO; MILLER, 1981; ZAJICEK; OREN; WEINREB, 1985; ARBER; ZAJICEK; ARIEL 1988; RAMALHO et al., 1998).

A regeneração do fígado é dependente principalmente de fontes de células tronco/ progenitoras endógenas incluindo hepatócitos, células progenitoras hepáticas, e células ovais (BAGHERI; BECKLEY; FARISH, 2001; FAUSTO; CAMPBELL, 2003; ALISON et al., 2004) e a presença de células mesenquimais no fígado é assunto ainda bastante controverso (SPAGNOLI et al., 1998; STRICK-MARCHAND et al., 2004). As células mesenquimais parecem surgir apenas em situações muito específicas, como nos casos em que hepatócitos são maciçamente destruídos e/ou estão impedidos de se replicar, por exemplo, em algumas formas de hepatite fulminante em humanos, ou após necrose hepática maciça induzida experimentalmente pelo tetracloreto de carbono (MICHALOPOULOS, 2007).

Nestas situações, as células mesenquimais tornam-se funcionantes, sendo capazes de gerar hepatócitos ou participar na origem de hepatocarcinomas (GERBER et al., 1983; FAUSTO, 1990; MICHALOPOULOS, 1990; RAMALHO et al., 1998, ALISON et al., 2000; MICHALOPOULOS, 2007). Células oriundas dos compartimentos biliares (ductos biliares e canal de Hering) transformam-se em células ovais e estas em hepatócitos quando a proliferação dos hepatócitos está inibida durante a regeneração. Hepatócitos periportais podem também converter-se em células biliares ou colangiócitos quando há lesão, mas sua capacidade de autorecuperação está inibida (MICHALOPOULOS, 2007) (Figura 10).



Fonte: (MICHALOPOULOS, 2007).

Figura 10 - Células oriundas do compartimento biliar (ductulos portais e canais de Hering) transformam-se em células ovais e estas em hepatócitos quando a proliferação é inibida durante a regeneração. Hepatócitos periportais podem também se transformar em células biliares, mas a capacidade delas se autogenerar está inibida. Hepatócitos e colangiócitos são células tronco facultativas entre elas mesmas

A associação de fatores usados como potentes mitógenos do hepatócito tais como fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento hepático (HGF), que tem comprovado ser capazes de induzir por si só crescimento do tamanho do fígado sadio nos animais, pode possivelmente, induzir uma melhor resposta, dentro de um menor período de tempo. Entretanto, com uma injeção diária da solução hepatotrófica o crescimento do fígado foi alcançado acompanhado por um aumento da taxa de mortalidade, com um comportamento bifásico, um pico durante os primeiros dias após o início das injeções e um segundo pico durante os últimos dias. Os dois picos foram atribuídos a diferentes causas, o primeiro relatado por uma possível toxicidade inicial da solução utilizada e o segundo pico foi minimizado pela redução do número de dias de injeções de 10 para 7, assim como para obter um número de animais sobreviventes dos quais os resultados pudessem ser analisados

estatisticamente sem prejudicar o aumento do tamanho do fígado (OPLETA et al., 1987; FUJIWARA et al., 1993; PARRA et al., 1994; PARRA et al., 1995).

A eficácia das formulações dos FH foi acompanhada pelo aumento da mortalidade dos animais (PARRA et al., 1992, 1994, 1995). Estudos em ratos hepatectomizados e com o uso de FH demonstraram que o aumento da massa hepática possibilita determinar mudanças na matriz extracelular, especialmente nos componentes do colágeno (PARRA, 1996).

A matriz extracelular contém organização estrutural que mantém o hepatócito num estado diferenciado e modula a reparação do fígado (BISSEL et al., 1990; MARTINEZ-HERNANDEZ; AMENTA, 1993a,b; PARRA, 1996; KOSTRUBSKY et al., 1998).

Durante o processo de regeneração hepática, o parênquima hepático cresce com diferenças nas velocidades de reprodução de seus elementos histológicos, sendo os hepatócitos os que apresentam crescimento mais rápido e o componente fibrilar do colágeno da matriz extracelular o mais lento. Isto confere maior friabilidade do fígado recém-regenerado (PARRA, 1996).

Em comparação dos níveis de fibras de colágeno hepático em um grupo de ratos sete dias após hepatectomia de 70%, com média de crescimento da massa residual de 71,5% ao outro grupo de sete dias após estimulação do crescimento de seus fígados sadios com média de crescimento de 121,05% pela administração intraperitoneal (portal) de FH foi capaz de induzir o crescimento hepático, a partir de fígados sadios estimulados pelos FH. A produção de colágeno foi semelhante a verificada após a hepatectomia de 70% (PARRA, 1996).

Estudos mostraram que em animais, com fibrose induzida, tratados FH apresentaram redução da proporção volumétrica do colágeno da matriz extracelular do fígado. Os animais receberam 40mL/kg por via intraperitoneal durante dez dias consecutivos. A proporção volumétrica de colágeno no fígado com fibrose induzida reduziu cerca de 40% nos animais do grupo tratado com fatores hepatotróficos exógenos, enquanto o grupo controle tratado com solução fisiológica na mesma dosagem a densidade volumétrica do colágeno permaneceu constante (PEREIRA et al., 2003).

Os FH têm um efeito maior quando administrado pela veia porta, imitando o caminho fisiológico, quando comparado à administração pela veia periférica (PARRA et al., 1992, 1995).

Foi demonstrado que a perspectiva da estimulação da regeneração do fígado pela administração de FH pela via portal tem grande aplicabilidade clínica nas situações de redução do tamanho do fígado após hepatectomia parcial ou necrose do hepatócito (hepatite e abscesso) e nas situações envolvendo o fígado sadio, tais como casos de transplante de doadores vivos, fornecendo ao receptor um maior segmento hepático implantável e ao doador uma maior massa residual do fígado. Além disso, os pacientes com cirrose em que a estimulação regenerativa pela hepatectomia parcial tem sido mostrada para produzir uma melhora histológica e funcional podem beneficiar deste método sem a inconveniência da função reduzida trazida pela hepatectomia (COSTA; SMORLESI, 1951; ISLAMI; PACK; HUBBARD, 1958; LEEVY et al., 1959; GALANTI; PUCHETTI, 1960; HANEY et al., 1972; SAAD, 1972; PARRA et al., 1982, 1995).

A regeneração dos hepatócitos depende dos hormônios tireoidianos que estimulam a expressão do gene de fatores de crescimento semelhante à insulina - IGF like nas células hepáticas (FORHEAD et al., 2000). Infusão pela veia periférica de hormônio tireóideo (T3) pode induzir pequenos, mas significantes aumentos na proliferação hepática em ratos sadios, um efeito que pode ser aumentado pela adição de glucagon, aminoácidos e heparina. Os hormônios tireóideos aumentam a proliferação dos hepatócitos nas culturas de células do fígado. Do mesmo modo, os aminoácidos aumentam a resposta da regeneração no fígado sadio e na proliferação dos hepatócitos em cultura (SHORT et al., 1972; BUCHER; PATER; COHEN, 1978; LEFFERT; KOCH, 1978; BAKER, 1985). Para o início e manutenção destas adaptações homeostáticas é necessário o envolvimento de mecanismos endócrinos e neuro-endócrinos, dos quais os hormônios da tireóide exercem importante papel como reguladores (BAUMAN; CURRIE, 1980; BAUMAN, 1992). A maioria deles é transportada sob a forma reversivelmente ligada às proteínas plasmáticas específicas sintetizadas pelo fígado. Aproximadamente 80% de T4 e 90% de T3 se fixam à A (TBG), e o restante liga-se principalmente à albumina (GOODMAN, 2000; GUYTON; HALL, 2002). Uma vez ligados às proteínas de fixação, os hormônios da tireóide apresentam distribuição regular nos tecidos-alvo, o que impede sua captação excessiva pelas primeiras células receptoras, logo após a secreção. Ligados, eles também são protegidos da degradação enzimática, mantendo um reservatório hormonal prontamente disponível, ao mesmo tempo em que são liberados de forma lenta para os tecidos, o que aumenta sua meia-vida (GOODMAN,

2000; PEREIRAS; HORTA, 2003). Há indícios de que os hormônios tireoidianos atuem também na membrana plasmática e mitocôndria. Eles estimulam a passagem de aminoácidos e íons através da membrana celular e incrementam o consumo de oxigênio mitocondrial com aumento na síntese de trifosfato de adenosina (ATP), o que dispersa energia na forma de calor tecidual para manter a temperatura corporal (DAVIS; DAVIS, 1996; DOUGLAS, 2002). Porém, o que está comprovado é que T3 penetra no núcleo e se fixa aos receptores ligados à cromatina, estimulando a enzima RNA polimerase ADN-dependente para dar início ao processo de transcrição, aumentando a síntese de RNA mensageiro (mRNA) que migrará para o citosol onde ocorrerá a síntese de proteínas próprias segundo o código genético, caracterizando sua ação genômica (MCNABB, 1995; BARRA et al., 2004). Diferente dos hormônios produzidos pela maioria das glândulas endócrinas, que têm um papel funcional altamente localizado (BIANCO, 2002), a maior parte dos tecidos possui receptores para os hormônios tireoidianos (GOODMAN, 2000; DOUGLAS, 2002; GUYTON; HALL, 2002). Por isso, a tireóide passa a ativar uma série de processos bioquímicos, desencadeando diversas respostas em todo o organismo, quer diretamente através de seus hormônios (DRAHOTA et al., 1999; SMITTH et al., 2002), ou em combinação com os hormônios de outras glândulas endócrinas (VELÁSQUEZ, 1997). Em humanos e nos animais domésticos, os hormônios tireoidianos ativam fatores de crescimento específicos para o desenvolvimento de dendritos, axônios e sinapses nervosas; atuam na maturação do cérebro do feto e do neonato, bem como no funcionamento do sistema nervoso central e periférico durante a vida adulta (ESCOBAR, 2001; SMITTH et al., 2002). Ainda atuam na diminuição das concentrações séricas de colesterol pelo aumento do número de receptores para lipoproteínas de baixa densidade (LDL) no fígado (DRAHOTA et al., 1999). A adição de T3 para a solução de fatores hepatotróficos mostrou uma tendência maior (50,68%) para a estimulação hiperplásica, um fato que foi esperado porque o hormônio tireóideo é conhecido como sendo um estimulador de síntese de ADN e da regeneração hepática, certamente causando um aumento na massa hepática em ratos não operados. Essa intensa simulação potencial do T3 foi também observado em grupo de ratos com dose dupla de T3 (2x - 14,125µg T3 em 100 mL de solução alcoólica), onde promoveu uma resposta maior em um período curto de 8 dias (aumento do fígado de 50,74% para 85,91%). Assim, o hormônio tireóideo parece ser um importante fator que, quando acrescentado à solução básica (fatores

hepatotróficos), pode causar uma maior estimulação da regeneração comparada ao obtido nos estudos anteriores (HIGGINS, 1933; STERNHEIMER, 1939; CANZANELLI; RAPPORT; GUILD, 1949; LEFFERT; SHORT et al., 1977; PARRA et al., 1992; PARRA et al., 1994).

Estudos demonstram que os hormônios tireoidianos podem aumentar a comunicação célula a célula, modulando a ação das chamadas junções comunicantes (junções *GAP*) no fígado de ratos (STOCK; SIES; STAHL, 1998). Tal efeito também é relatado em decorrência da ação de outros hormônios pertencentes à grande superfamília dos receptores intracelulares (EVANS, 1988), tais como o estrógeno (KLIEWER et al., 1992) e retinóides (YU, DAHL; WERNER, 1994). As junções comunicantes ou em fendas são grupos de canais intercelulares que permitem a troca de íons, de segundos mensageiros e de pequenos metabólitos entre as células de um tecido permitindo a coordenação da atividade celular, como a regulação do crescimento, a diferenciação e a sinalização do desenvolvimento. Os hormônios tireoidianos também podem influenciar a síntese de DNA e, portanto, a divisão celular durante a regeneração hepática em ratos, regulando a atividade de enzimas, como a timidinacina (MALIEKA; SUDHA; PAULOSE, 1997).

Incertezas persistem sobre como estes fatores interagem para iniciar a síntese de ADN e a divisão celular. Pesquisadores sugerem que a ação dos fatores hepatotróficos ocorre em duas fases para produzir a regeneração do fígado. De acordo com essa hipótese, os fatores, ou os ativadores mitogênicos, incluem o EGF, nutrientes e talvez prostaglandina e estimuladores da substância hepática, uma vez que reguladores intracíclicos, ou fatores de progressão do ciclo celular incluem o fator de crescimento epidermal, insulina, glucagon, e possivelmente o cálcio. O fator de crescimento epidermal e os nutrientes são os maiores controladores da primeira fase da regeneração hepática, e a insulina e o glucagon são os maiores controladores da segunda fase. A interação células/hormônios não-parenquimais pode também estar envolvida, desde então pequenos números de células não-parenquimais podem ser identificadas em culturas. Estudos futuros podem fornecer evidências sobre as fases da regeneração que estão envolvidas na regeneração hepática (LEFFERT et al., 1979; ARMATO; ANDREIS, 1983).

A partir dessas evidências foi estudado o comportamento biológico e funcional dos hepatócitos primários de ratos mantidos em cultura sob o estímulo da solução de fatores hepatotróficos em diversas condições experimentais.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

O material e os métodos empregados nesta investigação são descritos neste capítulo.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 30 ratos wistar (*Rattus norvegicus*) fêmeas, pesando em média 200g aproximadamente e com 120 dias de idade, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP. Os animais permaneceram em caixas de policarbonato, sob condições controladas de temperatura ($20\pm 4^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa do ar ($45\% - 75\% \pm 2-5\%$), com ciclo de 12 horas de claro/escuro, e receberam água (filtrada, $\text{pH} \pm 7.0$) e ração (Nuvilab[®]) *ad libitum*. A utilização dos animais segue as recomendações éticas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo FMVZ/USP, processo nº 1160/2007.

4.2 COLHEITA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Após a anestesia profunda dos animais com tiopental (Abbott[®]) (tiopental sódico) 40mg/kg de peso vivo, a cavidade abdominal foi exposta e a aorta abdominal canulada com catéter pediátrico 22G. Procedeu-se a ligadura da aorta abdominal cranial aos rins e caudal ao diafragma e o fígado foi perfundido *in situ* com solução tampão *Hank's Buffer Salt Solution (HBSS)* livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} (1mM/g) e acrescido de 10 ml de antibiótico penicilina-estreptomicina na concentração 10mL/L (Sigma[®] Chemical USA) e heparina (Roche[®] 100U/mL), durante 10 minutos ou até o fígado

apresentar coloração pálida; seguida pela liberação da solução pela veia cava caudal.

A seguir, o fígado foi perfundido *in situ* com solução tampão *HBSS* acrescido de cloreto de Ca^{2+} e cloreto de Mg^{2+} (1mM/g de tecido) e 100 U/mL de colagenase do tipo IV (0,025 a 0,05%) (Sigma® Chemical), durante 10 minutos ou até que o fígado apresentasse o parênquima friável, sem destruir a cápsula. Após a digestão enzimática o fígado foi retirado assepticamente da cavidade abdominal e transferido para um tubo de 50mL com *Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F12)* com 10% de soro fetal bovino (SFB), estéril e levado ao laboratório de cultura à 4°C. Os animais morreram por hipovolemia após exérese do fígado e as carcaças encaminhadas ao Biotério da FMVZ/USP para descarte.

4.3 CULTIVO CELULAR

4.3.1 Isolamento dos hepatócitos

Após a digestão enzimática em condições estéreis em fluxo laminar, os hepatócitos foram liberados mecanicamente com cuidado, mantendo o material em meio *DMEM/F12* acrescido de soro fetal bovino (SFB INVITROGEN®) 10% estéril. Após este período de dissociação, a suspensão foi filtrada em uma rede metálica (150) colocada sobre um béquer de 50mL e centrifugada a 50G, durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas em solução tampão *Hank's Buffer Salt Solution (HBSS)* livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} . As células foram ressuspensas em volume adequado de *Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F12)* (Sigma® Chemical) com 10% de SFB, lavadas duas vezes a 50G, durante 5 minutos e 4°C. O botão celular foi ressuspensado em volume adequado de meio de cultura e analisada a viabilidade e concentração celular pelo método de exclusão por Azul de Trypan. Foi obtido em média $2,5 \times 10^8$ células/mL com viabilidade de 90-95%. A suspensão celular foi purificada por centrifugação e gradiente de separação, utilizando 45% Percoll®

(Amersham Pharmacia Biotech AB), 5% Tampão *HBSS* 10x, 45% *DMEM/F12*, 5% soro fetal bovino, por 25 minutos, a 50G e 4°C. Após a retirada do anel de hepatócitos (Figura 11) foram realizadas duas lavagens em meio *DMEM/F12*. Foram avaliadas três diferentes concentrações celulares: 1×10^5 , $2,5 \times 10^5$ e 5×10^5 células/mL (Figura 2) e a $2,5 \times 10^5$ células/mL foi utilizada por apresentar maior viabilidade ($\geq 97\%$).

Os hepatócitos foram colhidos, cerca de $2,5 \times 10^5$ células/mL foram contadas e plaqueadas em placas de 6 orifícios de 125cm^2 com *DMEM/F12* (Sigma® Chemical), acrescido de 10% de SFB, incubados a 37°C, em estufa com 5% de CO_2 por 5 dias. O meio de cultura foi trocado após 24 horas e em intervalos de três dias.

4.3.2 Caracterização celular imunocitoquímica e citometria de fluxo para avaliação da citoqueratina 8, 18 e desmina

As células epiteliais são caracterizadas pela presença de grupos específicos de filamentos intermediários denominados citoqueratinas (CKs), que constituem uma complexa família com no mínimo 20 diferentes tipos de polipeptídios expressos em vários tipos de epitélio, com sua localização intercelular variando de acordo com o estágio de desenvolvimento, tipo celular, diferenciação tecidual e alterações patológicas (CHU, WEISS, 2002).

Alguns autores analisaram o desenvolvimento embrionário do fígado através da pesquisa imuno-histoquímica de citoqueratinas individuais. Estes autores demonstraram que as células epiteliais no fígado em desenvolvimento apresentam CK8 e CK 18 desde o início de seu desenvolvimento embrionário (DESMET, 1985, SHAH; GERBER, 1989, STOSIEK; KASPER; KARSTEN, 1990).

A caracterização dos hepatócitos foi realizada pelo ensaio imunocitoquímico descrito a seguir: as culturas primárias de hepatócitos após 24, 48 e 72 horas foram fixadas e permeabilizadas. O meio de cultura foi retirado com cuidado, as células foram lavadas com solução tampão fosfato de sódio (*PBS*) por três vezes; fixadas com paraformaldeído 4%, pH 7.5, durante 10 minutos à 4°C; lavadas novamente com solução tampão por três vezes; permeabilizadas com acetona P.A., durante 10 minutos em freezer à -20°C; lavadas com solução tampão por mais três vezes e

mantidas em geladeira à 4°C com *PBS* até o momento do experimento. Em seguida foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena (80mL de álcool metílico e 20mL de peróxido de hidrogênio 30%) por imersão dessas placas de dois orifícios (CultureSlides - BD®), durante 30 minutos ao abrigo da luz. Em seguida foram realizadas três lavagens com *PBS* (Na_2HPO_4 74,7mM; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 24,9mM ou $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 15,9mM; NaCl 14,6mM e água destilada qsp 1000mL), por 5 minutos.

Após o bloqueio, as lâminas foram incubadas com o anticorpo monoclonal mouse anti-citoqueratina 18 (clone C-04, Santa Cruz®) na concentração de 1:100 diluídos em uma solução contendo 125µL de BSA (albumina sérica bovina fração V) com 250µL de azida sódica em 6mL de *PBS*. As placas foram incubadas em câmara úmida *overnight* à temperatura de 4°C.

Após a incubação, as placas foram lavadas com *PBS* e em seguida foram adicionados 400µL do Advance™ HRP Link (Kit Advance™ HRP DAKO®) incubados por 30 minutos e lavadas de 5 minutos com *PBS*. As placas foram novamente lavadas com *PBS*, para a adição de 400µL do Advance™ HRP Enzyme (Kit Advance™ HRP-DAKO®) por 30 minutos. A lavagem foi realizada com *PBS* e as lâminas desconectadas das placas para a revelação. Cerca de 2mL do cromógeno DAB (diaminobenzidina) (Sigma® Chemical) dissolvidos em 20 mL de água destilada, adicionados a 1,5µL de peróxido de hidrogênio 30%, colocados sobre as células recobrimo-as por completo, durante 30 segundos e lavados imediatamente em água destilada. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina durante 10 segundos e rapidamente lavadas com água corrente, seguidas pela bateria de desidratação iniciando com álcool 70°, álcool 95°, álcool 100° I, álcool 100° II, álcool-xilol, xilol I, xilol II. As lâminas foram secas com lenço de papel, preparadas com a resina Alkian® receberam a cobertura de lamínulas. As lâminas preparadas foram observadas em microscópio de captura de imagem Zeiss modelo BX50 – Câmera DP71 – OLYMPUS. O controle negativo foi processado da mesma maneira que as amostras, com exceção da incubação do anticorpo primário que não foi adicionado às células.

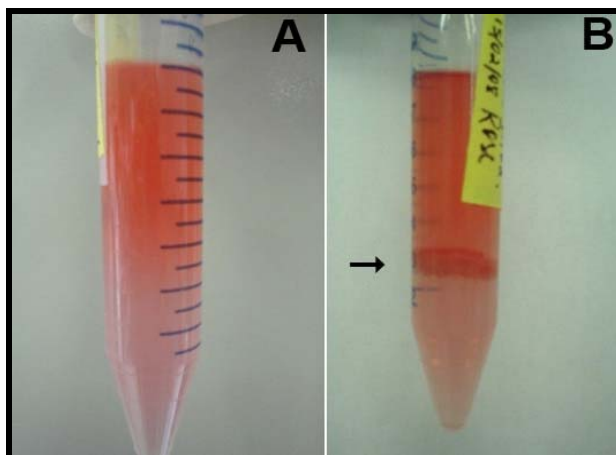


Figura 11 - (A) Gradiente de densidade Percoll; (B) Anel de hepatócitos (seta)

As culturas primárias de hepatócitos após 24 e 72 horas foram permeabilizadas com solução tampão fosfato de sódio e 0,1% de Triton X100[®]. O meio de cultura foi retirado com cuidado e as células lavadas com solução tampão fosfato de sódio (*PBS*) por três vezes; fixadas com paraformaldeído 4%, pH 7,5, durante 10 minutos à 4°C.

A determinação das proteínas do citoesqueleto, CK-8 e 18 e a proteína pertencente à família do filamento intermediário, desmina foi avaliada por citometria de fluxo, em alíquotas de 100µl (10⁶células/mL) das culturas primárias de hepatócitos tratados com os fatores hepatotróficos nas concentrações 1X e 10X, nos períodos de 24 e 72 horas foram incubadas por 1 hora, à 4°C com 1µg de anticorpo específico anti-CK-8, 18 e desmina (Santa Cruz[®] e Abcam[®], USA) e após este período foram novamente incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), Alexa-fluor 488 (Molecular Probes[®]). Após a ligação específica do anticorpo secundário as células foram centrifugadas à 800G e lavadas com *PBS* gelado. O sobrenadante foi desprezado e o botão celular ressuspensionado em *PBS* contendo 0,1% de paraformaldeído e albumina sérica bovina.

A aquisição dos histogramas e *dot plots* dos marcadores do citoesqueleto e filamento intermediário em hepatócitos foram realizadas em citômetro de fluxo FACScalibur (Fluorescence Activated Cell Analyser – Becton & Dickinson, USA), seguida da análise pelo programa *Cell Quest* (BD), com aquisição de 10.000

eventos, tendo como parâmetros *FSC* (tamanho) e *SSC* (granulosidade/complexidade) em escala linear e *FL1* em escalas logarítmicas, que detecta a fluorescência da ligação do complexo antígeno/anticorpo conjugado ao fluorocromo *FITC*.

4.3.3 Procedimento experimental

Após 24 horas de cultura primária os hepatócitos isolados de cada animal receberam os seguintes tratamentos:

A) Grupo Controle (S/FH)

Os hepatócitos isolados dos animais normais foram incubados com meio de cultura *DMEM/F12* (Sigma®) (Anexo A) e avaliados os parâmetros celulares, nos intervalos de 24, 48 e 72 horas.

B) Grupo Fatores Hepatotróficos (FH)

Os hepatócitos isolados dos animais normais foram incubados com solução de fatores hepatotróficos (Tabela 1), descrito por Parra et al. (1992, 1995, 1996) nas concentrações 1X, 5X e 10X e avaliados os parâmetros celulares, nos intervalos de 24, 48 e 72 horas.

Tabela 1 – Composição da solução de fatores hepatotróficos (SFH)

Fatores hepatotróficos		Solução de aminoácidos	
Glicose	104g	L-isoleucina	370mg
Solução de aminoácidos	200mL	L-leucina	980mg
Piridoxina	2mg	L-acetato de lisina	590mg
Pantonato de cálcio	2mg	L-metionina	530mg
Tiamina	30mg	L-treonina	490mg
Fosfato de riboflavina	4mg	L-triptofano	180mg
Cloridrato de potássio	1,43g	L-valina	530mg
Bicarbonato de sódio	1,50g	L-arginina (base)	1060mg
Nicotinamida	50mg	L-histidina (base)	460mg
Fosfato de monopotássio	750mg	L-alanina	1030mg
Sulfato de magnésio	500mg	L-asparagina	380mg
Vitamina C	500mg	L-ácido aspártico	270mg
Insulina	62,5UI	L-ácido glutâmico	250mg
Glucagon	0,625mg	L-cisteína	30mg
Ácido Fólico	2,5mg	L-ornitina	260mg
Vitamina B12	3,125mg	L-prolina	840mg
Sulfato de Zinco	31,25µg	L-serina	250mg
Água destilada (q.s.)	500mL	L-tirosina	160mg
		L-glicina	800mg
		L-fenilalanina	540mg
		Água destilada (q.s.)	100mL

Fonte: (PARRA et al., 1992, 1995, 1996).

Além dos fatores hepatotróficos acima mencionados, cada cultura recebeu 0,25µg/1000µl da solução de L-triiodotironina (T3) (Triac®), 1mg/UI de Glucagon (Glucagen®) e 10µg/mL de insulina humana (NPH) (Novolin® N - Novo Nordisk).

4.3.3.1 Metabolismo celular e parâmetros celulares

O metabolismo hepático após o tratamento com a solução de FH foi avaliado pelas seguintes metodologias:

- ✓ capacidade de metabolização hepática do corante verde de indocianina;
- ✓ peroxidação lipídica por meio da quantificação espectrofotométrica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no sobrenadante da cultura de hepatócitos;

- ✓ quantificação de fibras de colágeno por espectrofotometria pelo método picrossírius e
- ✓ análise das fases do ciclo celular pela citometria de fluxo.

4.3.3.2 Capacidade de metabolização hepática do corante verde de indocianina (ICG-Cardiogreen®)

O verde de indocianina (VIC) é um marcador utilizado para avaliar função hepática, não sofre reação de oxirredução no fígado e é excretado exclusivamente pela bile (JOO; LEE, 1998). O verde de indocianina é um corante aniônico orgânico, isto é, possui carga negativa, que forma complexos fluorescentes não covalentes com proteínas. O VIC é solúvel em água, a solução a 0,5% tem pH em torno de 6,0 e é estável por cerca de 8 horas. As soluções foram preparadas no momento do uso. O VIC 25mg foi dissolvida em 5mL de água ultrapura e então acrescida de 20mL de *DMEM/F12* com 10% de SFB. A concentração da solução final de VIC é 1mg/mL. As células cultivadas em meio *DMEM/F12* acrescido de 10% SFB e que receberam diferentes concentrações dos FH (1X, 5X e 10X), foram analisadas em intervalos de 24, 48 e 72 horas após a adição de 10 μ L/poço (placa de 96 orifícios) da solução de VIC (Figura 12). Foram incubadas à 37°C e a leitura realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 805nm nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos.

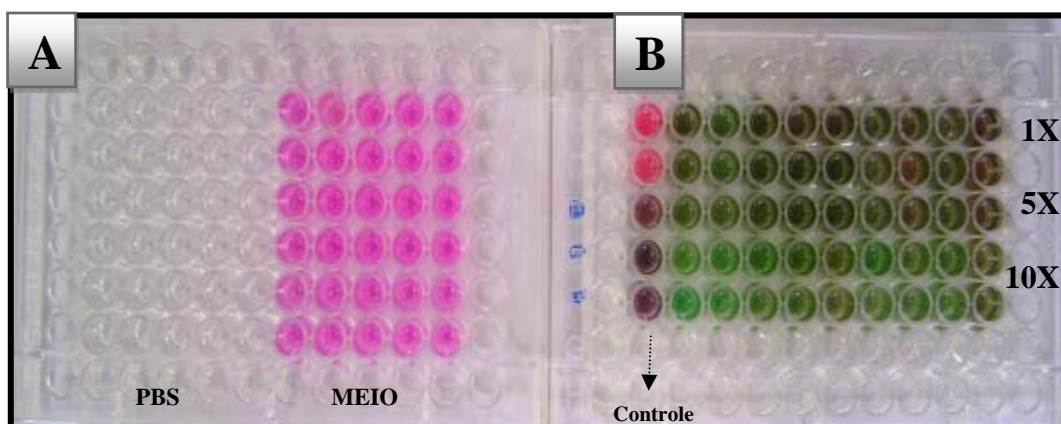


Figura 12 - Avaliação do verde de indocianina (VIC); em (A) Controle meio de cultura e PBS e (B) Sobrenadante da cultura primária de hepatócitos com a adição dos FH na concentração de 1X, 5X e 10X

4.3.3.3 Método colorimétrico MTT

O método baseia-se na medida da atividade da enzima succinato-desidrogenase mitocondrial (componente do complexo II do ciclo de Krebs), a qual, se ativa, sendo capaz de metabolizar o reagente MTT (3-[(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]), composto de coloração amarela, em cristais de formazan de cor violeta, portanto, ocorrendo somente em células vivas. O teste do MTT se baseia no princípio da conversão do substrato amarelo pelas desidrogenases mitocondriais de células vivas em cristais de formazan, de cor violácea (HANSEN; NIELSEN; BERG, 1989).

As células cultivadas em meio *DMEM/F12* (Sigma® Chemical) acrescido de 10% SFB receberam diferentes concentrações dos FH (1X, 5X e 10X), que foram analisadas em intervalos de 24, 48 e 72 horas pela mensuração da atividade de succinato desidrogenase mitocondrial. Após a separação dos hepatócitos por gradiente de densidade, as células foram coletadas e a concentração dessa suspensão foi ajustada para 1×10^4 células/poço, plaqueadas com 100µL em placas de 96 orifícios de fundo chato em triplicata.

Os hepatócitos foram mantidos em cultura em estufa a 37°C e 5% de CO₂ durante 24, 48 e 72 horas, após a adição dos FH. A cada período o sobrenadante foi retirado, armazenado em uma placa espelho, identificado e mantido em freezer a -20°C para posterior quantificação de fibras de colágeno (Figura 13) e de peroxidação lipídica. Três horas antes do término do tempo de exposição, o meio de cultura tratado, contendo os FH foi removido e adicionado a cada poço 25µl de MTT® (Sigma, St Louis, MO) na concentração de 5µg/poço no escuro, coberta com papel alumínio e incubadas por 4 horas, a 37°C em estufa de CO₂.

Para a completa solubilização dos cristais de formazan formados foi acrescido, após o término do tempo de exposição, um volume de 100µl/poço de metanol P.A. gelado e realizada leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540nm possibilitando quantificar viabilidade celular e se a solução induz ou não proliferação. Os experimentos foram realizados em n=120 poços e os resultados apresentados como porcentagem da viabilidade (média ± desvio padrão), em relação ao controle (Tabela 2).

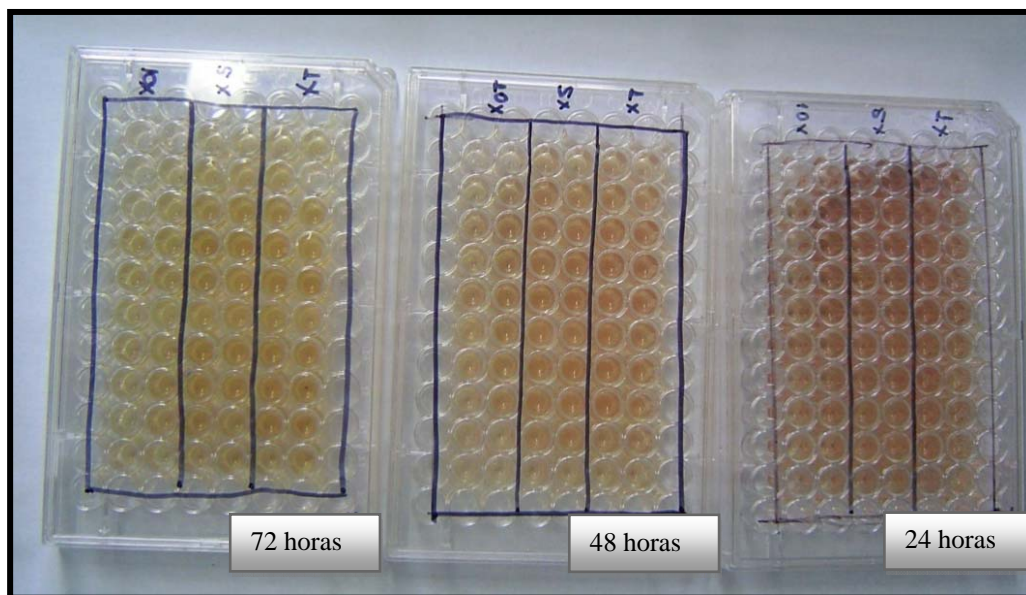


Figura 13 - Placa espelho com sobrenadante da cultura de hepatócitos para posterior avaliação da mensuração de colágeno e a formação de radicais livres pela peroxidação lipídica

4.3.3.4 Quantificação de colágeno por espectrofotometria com Picrossírius-red

O uso do picrossírius tem contribuído significativamente para a identificação e compreensão do colágeno e de suas funções. A especificidade do método é baseada na presença de aminoácidos básicos nas moléculas do colágeno que reagem fortemente com o corante ácido (Sírius-red). Essa reação aumenta a birrefringência normal do colágeno, composto por moléculas agregadas. A diferenciação dos tipos do colágeno também é possível, sendo o tipo I fortemente birrefringente, fibras espessas amarelas ou vermelhas; tipo III pouco refringentes, esverdeados e o tipo II ainda menos refringentes (VALAZQUEZ; MONTES; RUIZ-ALBUSAC, 1990).

Inicialmente foram preparadas soluções de colágeno tipo I bovino (Sigma®) em *PBS*. A solução mãe de colágeno foi preparada na concentração de 1mg/mL e realizada a curva padrão (1) nas seguintes concentrações: 300; 200; 100; 50; 25;

12,5 e 6µg/mL e a curva padrão (2) nas concentrações: 160; 100; 80; 60; 40; 20 e 10µg/mL.

Como controle do meio de cultura o procedimento também foi realizado com colágeno diluído em *DMEM/F12* (10% de SFB) a mesma utilizada nas culturas primárias de hepatócitos.

Após a adição de 50µL de cada uma das diluições de colágeno em placas de 96 orifícios de fundo chato em quadruplicata as placas foram secas em estufa a 37°C *overnight*. Após 24 horas as culturas foram fixadas com 200µL de solução saturada de BOUIN por 1 hora preparada no momento de sua utilização (Figuras 14 e 15). O fixador foi removido cuidadosamente de cada poço e adicionado 300µL de água destilada e remoção dos precipitados. As placas foram secas à temperatura ambiente durante 2 horas e acrescentado 200µL do corante PICROSSÍRIUS-RED diluído em solução saturada de ácido pícrico por 1 hora, sob leve agitação, ao abrigo da luz (Figura 16). Removido o corante cuidadosamente em bomba de vácuo por sucção, lavados com 250µL de ácido clorídrico (HCL) a 0,01M para remoção do corante não aderido

Após a adição de 150µL da solução da NaOH a 0,1M em cada poço sob agitação por 30 minutos. O corante aderido foi eluído. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 550nm. Os valores médios foram plotados e construído um gráfico de dispersão com as concentrações conhecidas de colágeno com os valores do eixo X e as densidades óticas correspondentes a cada concentração com os valores do eixo Y e calculado a equação da reta e o coeficiente de correlação $R^2(y= 0,0046x + 0,1626 - R^2= 0,971)$.

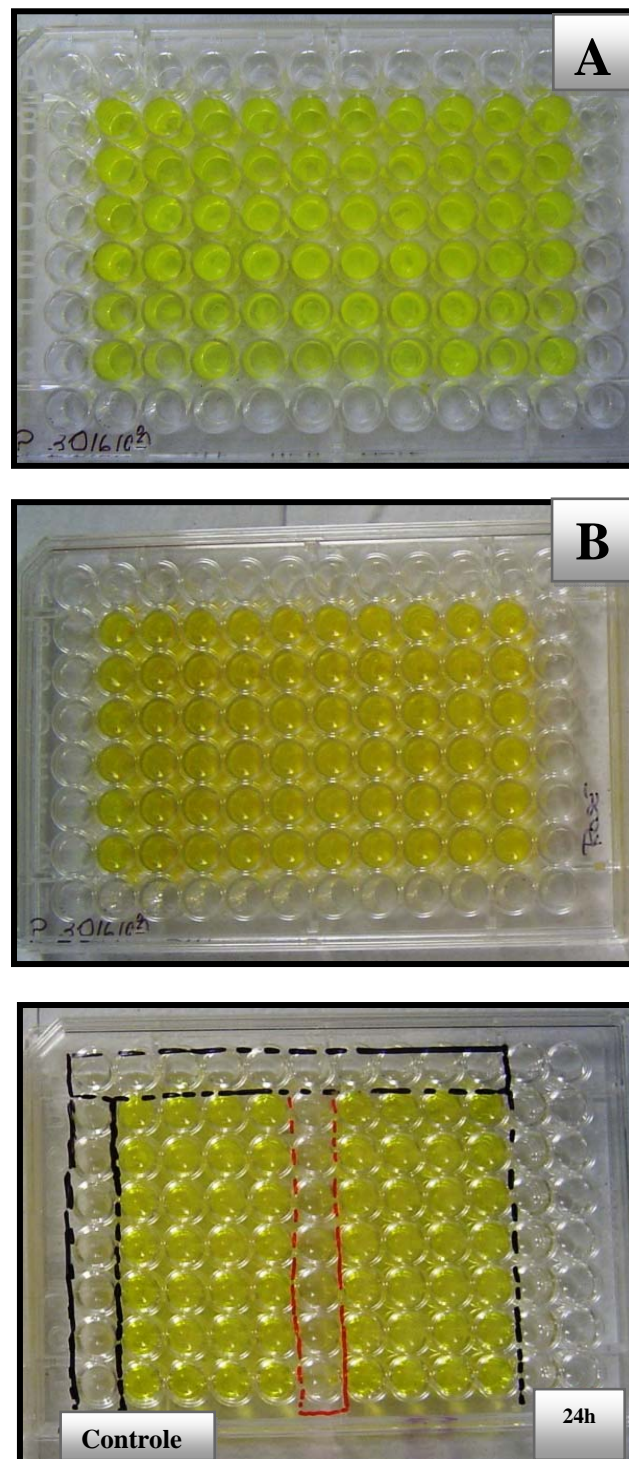


Figura 14 - (A, B) Aspecto da fixação do sobrenadante secretado pela cultura primária de hepatócitos e (C) curva padrão após a incubação com a solução saturada de Bouin por 1 hora

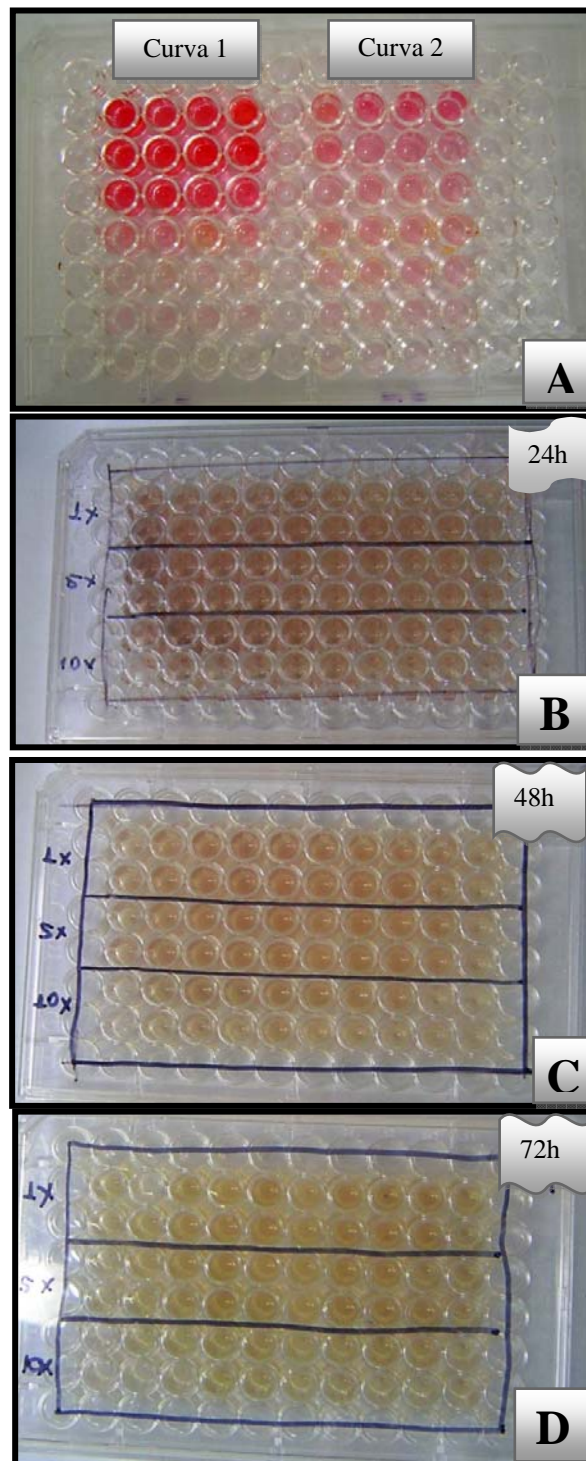


Figura 15 - (A) Curva padrão de colágeno bovino tipo I (Sigma®) e (B, C, D) Amostras de sobrenadante de 24, 48 e 72 horas de cultura primária de hepatócitos pelo método colorimétrico de Picrossírius-red

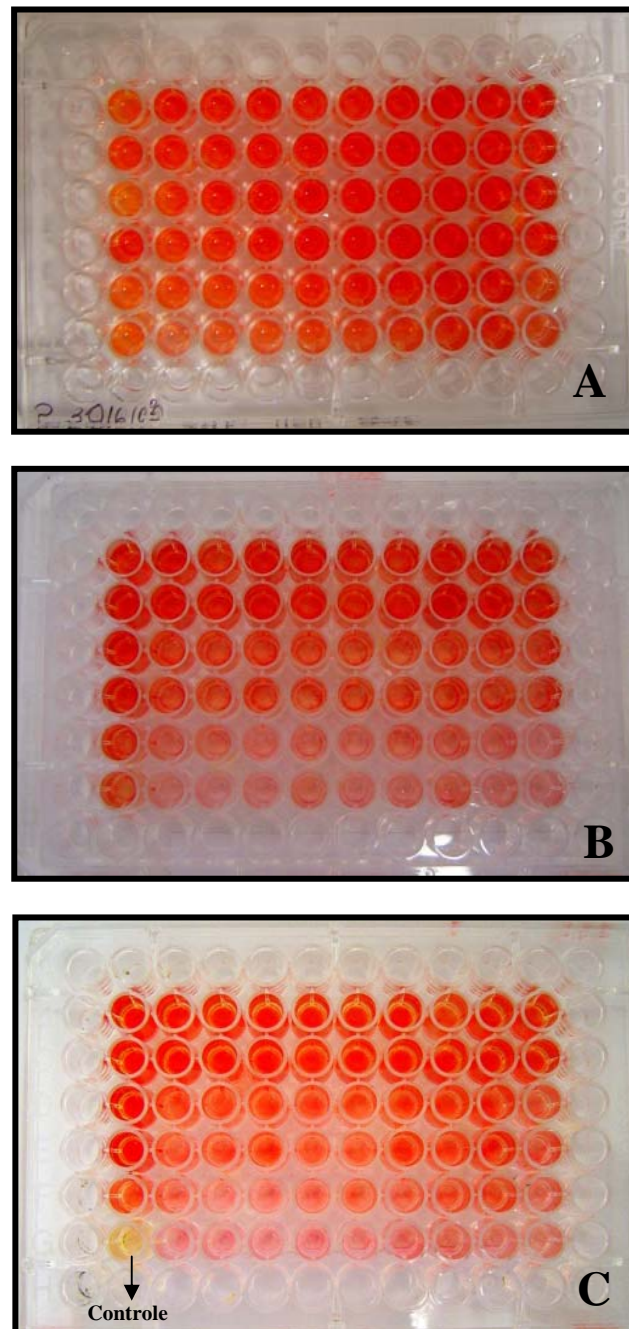


Figura 16 - (A) Análise colorimétrica do método de Picrossírius-red em cultura primária de hepatócitos após a adição dos FH, 24 horas, (B) 48 horas e (C) 72 horas

4.3.3.5 Medida da lipoperoxidação *in vitro* (LPO)

Em 1899, Lorrain-Smith já discutia os efeitos tóxicos do oxigênio sobre componentes biológicos, tornando-se objeto de intensa investigação científica nos últimos anos (HALLIWELL, 2000). Estes efeitos são resultantes da oxidação de componentes celulares como tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lípidios, principalmente ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), mediada por espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), conhecidas genericamente como radicais livres (RL) (GILLER; SIGLER, 1995; ROMERO et al., 1998). A reação destas espécies com os AGPI, presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), que pode ser avaliado e utilizado como um indicador do estresse oxidativo celular (LIMA; ABDALLA, 2001).

O método da peroxidação lipídica segue o que foi descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990), que se baseia na determinação de malonaldeído (MDA) devido à sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Aldeídos sempre são produzidos em processos de peroxidação lipídica, sendo o malonaldeído o mais abundante. Cada molécula de MDA reage com duas moléculas de TBARS, gerando uma coloração que pode ser detectada em espectrofotômetro.

Para a avaliação da peroxidação foi utilizada a técnica de Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979), baseada na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), predominantemente o malonaldeído (MDA), que ocorre após a lipoperoxidação das membranas celulares. Estes compostos produzem uma coloração característica (rosa), que foi medida espectrofotometricamente no comprimento de onda de 535nm. Avaliou-se a degradação oxidativa de ácidos graxos presentes em sobrenadante da cultura de hepatócitos na presença ou ausência dos fatores hepatotróficos (FH).

Alíquotas de 50µL do sobrenadante da cultura primária de cada amostra, conforme delineamento experimental tratada com 1X, 5X e 10X da SFH e grupos controles nos intervalos de 24, 48 e 72 horas; foram adicionados 250µL de ácido tricloroacético 20% (TCA) e em outra série adicionados 250µL de TCA 20% e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,86% na proporção v/v. As amostras foram mantidas por 10 minutos em banho-maria, a 100°C. Após este período os tubos correspondentes de

TCA e TCA/TBA foram imediatamente imersos em banho-de-gelo por 10 minutos e centrifugados por 4 minutos a 70G.

Foram retirados 50µL do sobrenadante de cada amostra e acondicionados em placa de 96 orifícios, conforme delineamento experimental. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 535nm. O cálculo da medida da lipoperoxidação foi realizado subtraindo-se os valores do branco de cada série e a absorbância média da série de TCA foi obtida pela diferença da absorbância da TCA/TBA e dividindo-se pelo coeficiente molar do malonaldeído (MDA), conforme a expressão matemática:

$$\text{LPO} = \frac{(\text{média da absorbância TCA/TBA} - \text{branco}) - (\text{média da absorbância TCA} - \text{branco})}{0,0312 \text{ (coeficiente de molar MDA)}}$$

Os resultados foram expressos em nmoles de MDA/mL de sobrenadante (nmoles/mL)

4.3.4 Análise das fases do ciclo celular das culturas primárias de hepatócitos após a adição dos FH estudados, por citometria de fluxo

Em biologia, chama-se ciclo celular o conjunto de processos que se passam numa célula viva entre duas divisões celulares. O ciclo celular consiste na interfase e na fase mitótica, que inclui a mitose e a divisão celular (citocinese).

4.3.4.1 Fases do ciclo celular – Interfase

A vida de uma célula começa no momento em que a divisão celular que a originou acaba e o momento em que ela se divide ou morre. A interfase corresponde ao período entre o final de uma divisão celular e o início da segunda. Trata-se de um período de intensa atividade na célula, sendo neste momento que ocorre a

duplicação do material genético. Geralmente a célula encontra-se nesta fase durante a maior parte da sua vida. A interfase divide-se em três fases:

- ✓ Fase G1: fase de síntese de proteínas, enzimas e RNA;
- ✓ Fase S: fase de auto-replicação das moléculas de DNA, a partir deste momento os cromossomos passam a possuir duas cromátides ligadas por um centrômero;
- ✓ Fase G2: período de síntese de moléculas necessárias à divisão celular.

4.3.4.2 Regulação do ciclo celular

O ciclo celular pode parar em determinados pontos e só avança se determinadas condições se verificarem, tais como a presença de uma quantidade adequada de nutrientes ou quando a célula atinge determinadas dimensões. A regulação do ciclo celular é realizada por ciclinas e por quinases ciclino-dependentes (Figura 17). Certas células, como os neurônios, param de se dividir quando o animal atinge o estado adulto, mantendo-se durante o resto da vida do indivíduo na fase G0. Existem três momentos em que os mecanismos de regulação atuam:

Na fase G1:

- ✓ No fim desta fase existem células que não iniciam um novo ciclo ou que não estão em condições de fazê-lo, essas células permanecem num estágio denominado G0.

As razões para a célula passar para o estágio G0 podem ser:

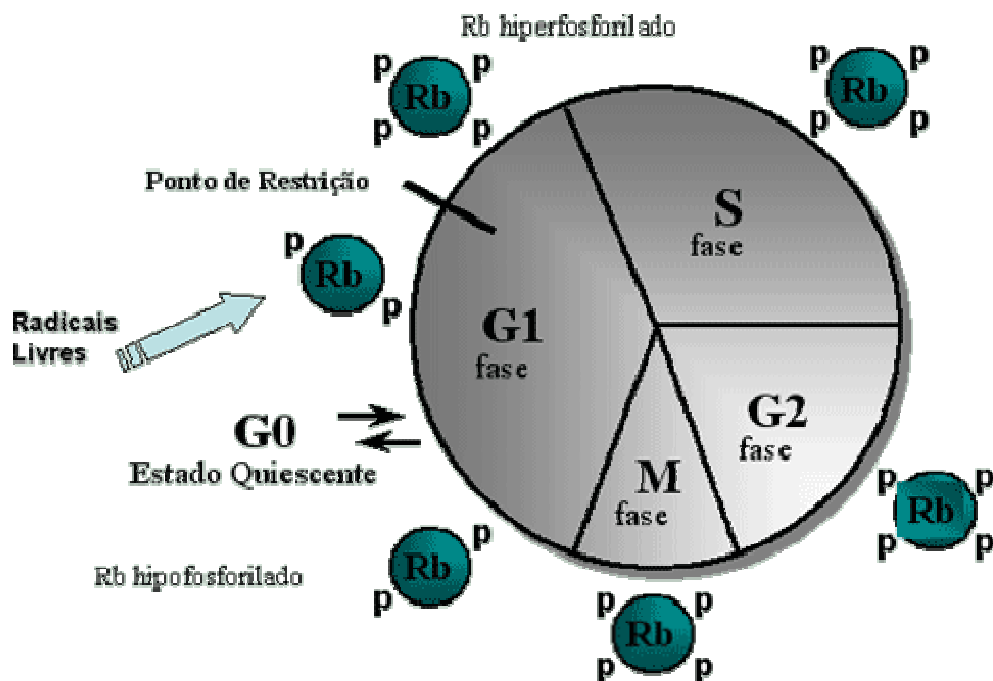
- ✓ células que não se dividem mais, essas células permaneceram neste estágio até a sua morte, são exemplos os neurônios e as células das fibras musculares;
- ✓ células que não obtiveram a quantidade de nutrientes necessária;
- ✓ células que não atingiram o tamanho requerido.

Na fase G2:

- ✓ Antes de iniciar-se a mitose existe outro momento de controle caso a replicação do DNA não tenha ocorrido corretamente o ciclo pode ser interrompido e a célula volta a iniciar a fase S.

Na metáfase:

No final da metáfase evidenciam-se mais um mecanismo de regulação responsável pela verificação da ligação do fuso acromático com os cromossomos, de forma que migre sempre uma das cromátides para os pólos.



Fonte: www.sistemanervoso.com

Figura 17 - Fases do ciclo celular

A citometria de fluxo é uma tecnologia, baseada no emprego de radiação laser, fluxo hidrodinâmico, ótica, substâncias fluorescentes (fluorocromos), recursos de informática, utilizadas para determinar algumas características estruturais e funcionais de partículas biológicas. Esta tecnologia é usada para determinar componentes e propriedades de células e organelas celulares que fluem através de uma suspensão celular. Os citômetros de fluxo têm como princípio básico aspirar as células ou partículas contidas em um meio previamente preparado e forçá-las a

passar por uma câmara especial (*flow cell*) que faz com que a células fiquem envolvidas e centralizadas em um fluxo contínuo de líquido (*sheath fluid*) e saiam dessa câmara uma atrás da outra de modo que apenas uma única célula seja interceptada pelo feixe de laser (GIVAN et al., 1999).

Após ser interceptada pelo laser, uma parte de luz é espalhada (*scatter*) conforme suas características morfológicas e estruturais. O *Forward Scatter* (FS) relaciona-se com o tamanho da célula e o *Side Scatter* (SS) com a granulosidade de cada célula ou partícula (GIVAN et al., 1999). Foram separadas $2,5 \times 10^5$ células/mL ressuspendidas em etanol 70% na presença de $1 \mu\text{g}$ de RNase (Sigma®) por 2 horas, ou por 20 dias a -20°C para posterior análise das fases do ciclo celular. As suspensões celulares ($2,5 \times 10^5$ cel/mL) das culturas primárias de hepatócitos tratados com FH nas concentrações de 1X, 5X, 10X e controles foram centrifugadas duas vezes a 3000rpm com solução *PBS* e ressuspendidas em $200 \mu\text{L}$ solução de iodeto de propídio (20mg/mL, Sigma®), $20 \mu\text{L}$ de Triton X-100 e 4mg RNase - A, por trinta minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz e transferidas para tubos de citometria, as imagens adquiridas em citômetro de fluxo (Scalibur-Becton e Dickson) e analisadas em Software Cell-Quest. As fases do ciclo celular pré e pós-mitóticas (hipodiplóide, G0-G1, fase S e G2-M) foram analisadas em programa *FlowJo*.

4.3.5 Avaliação da Atividade Apoptótica – Anexina V

A finalidade desta análise é determinar quantitativamente a porcentagem de células apoptóticas em razão da habilidade de se ligarem a anexina V e de excluir o iodeto de propídio (IP). Anexina V é um membro ligante de cálcio e proteínas ligadas a fosfolípidios, é uma proteína com atividade anticoagulante vascular, que é encontrada pela maior parte da face citosólica das membranas. A utilidade da anexina V em aplicações de citometria de fluxo é derivada de sua afinidade seletiva para fosfolípidios negativamente carregados. As culturas primárias de hepatócitos e grupos controles submetidos aos tratamentos com os FH, paclitaxel e etoposídeo foram lavadas 2x em *PBS* a 4°C , ressuspendidas em $100 \mu\text{L}$, e incubadas por mais 30 minutos com $1 \mu\text{g}$ de anexina V-FITC (Santa-Cruz) e $18 \mu\text{g/ml}$ de solução de iodeto de propídio (Sigma® Chemical).

As células que expressam a fosfatidilserina na face exterior das membranas celulares ligam a anexina V e as células com uma membrana celular comprometida permitem que o iodeto de propídio ligue-se ao ADN celular. As células resultantes, quando analisadas imediatamente por citometria de fluxo, apresentam três potenciais populações celulares: as células vivas não marcadas, células necróticas marcadas com ambos os fluorocromos ou em apoptose marcada somente com o reagente *FITC* da anexina V.

4.3.6 Determinação do potencial da membrana mitocondrial

A rodamina-123 (Rh-123) é um fluorocromo específico para a marcação mitocondrial em células vivas. O fato de ser um fluorocromo catiônico carregado positivamente permite que seja atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior destas organelas. Alterações na integridade mitocondrial podem ser detectadas através do aumento da fluorescência verde citosólica, indiciando uma difusão da Rh-123 da mitocôndria para o citosol (JOHNSON et al., 1980; BENEL et al., 1986).

Para a visualização das mitocôndrias e seu potencial protoiônico, os hepatócitos mantidos em cultura e cultivados na presença e ausência dos FH nas concentrações de 1X e 10X, após 24 e 72 horas foram incubadas com rodamina (Rh-123 - Molecular Probes®), por 30 minutos em estufa de cultura CO₂ 5% umidificada à 37°C.

A solução estoque de Rh-123 foi diluída em metanol e as diluições de incubação foram realizadas em meio de cultura contendo: sacarose 1,25mM, cloreto de potássio 65 mM, fosfato de potássio 2mM, cloreto de magnésio 1mM, EGTA 0,1mM, Hepes-KOH 10 mM e succinato 5 mM, pH 7,4.

A análise e aquisição das modificações do potencial elétrico da membrana mitocondrial foram realizadas em citômetro de fluxo e os histograma da intensidade de fluorescência FL1-H adquirida pelo programa *Cell Quest Pro*® A Rh-123 é um componente catiônico que excita a 488 nm e emite fluorescência verde a 515-575 nm (JOHNSON et al., 1981). O potencial de membrana foi determinado em citômetro

de fluxo FACScalibur® (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA).

4.3.7 Determinação bioquímica das transaminases hepáticas, gama glutamil transferase e amilase

O princípio do método enzimático empregado para avaliação das atividades das Transaminases Glutâmico-Oxalacética (TGO) e Transaminases Glutâmico-Pirúvica (TGP) foi baseada no consumo de nicotinamida adenina dinucleotídeo - NADH pelo produto formado a adição de cetogluturato a estas enzimas. A TGO catalisa a transferência do grupo amina do aspartato para o cetogluturato com formação de glutamato e oxalacetato que é reduzido a malato por ação da enzima malato desidrogenase (MDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD⁺.

O procedimento experimental foi constituído pela determinação da concentração protéica pelo método de Bradford dos constituintes do citosol dos hepatócitos antes e após seu crescimento em cultura e a adição dos fatores hepatotróficos. Foram adicionados de 100 µl da amostra a 300 µl do reagente de uso, para a TGP constituído de uma mistura de quatro volumes de Tampão contendo Tris 110 mmol/L pH 7,3, L-alanina 550 mmol/L e LDH 1350 U/L, 1 volume de Coenzima contendo 2-cetogluturato 198 mmol/L e NADH 2,6 mmol/L, após a homogeneização os tubos foram incubados em banho 37°C e imediatamente acionado o cronômetro, após o primeiro minuto foi realizada a primeira leitura da absorbância (A1), e as outras leituras de absorbância realizadas exatamente, após 1, 2 e 3 minutos, o cálculo foi obtido pelo decréscimo de absorbância médio por minuto. As leituras foram realizadas em espectrofotometro (Thermo Plate) em comprimento de onda de 340 nm.

A determinação da TGO seguiu o mesmo protocolo, porém, o tampão foi composto da mistura de Tris 88 mmol/L pH 7,8, L-aspartato 264 mmol/L, MDH 460 U/L e LDH 660 U/L e a coenzima 2-cetogluturato 198 mmol/L e NADH 2,6 mmol/L (HENRY, 1996; KAPLAN; PESCE, 1996).

A determinação da amilase foi realizada em 100 µl da amostra do citosol dos hepatócitos dos grupos S/FH e após adição dos FH 1X e 10X 24 e 72 horas.

Alíquotas da amostra foram adicionadas em 300 μ l do reagente de uso, α - (2- Cloro-4- nitrofenil)- β - 1,4- Galactopyranosilmaltoside 2,25mmL/L, cloreto de sódio 350mmL/L, acetato de cálcio 6mmL/L, sulfocianeto de potássio 900mmoL/L e azida sódica 15mmoL/L e ajustado o pH final para 6,0. Após a homogeneização os tubos foram incubados em banho 37°C e imediatamente acionado o cronômetro, após o primeiro minuto foi realizada a primeira leitura da absorbância (A1), e as outras leituras de absorbância realizadas exatamente, após 1, 2 e 3 minutos, o cálculo foi obtido pelo decréscimo de absorbância médio por minuto. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Thermo Plate®) em comprimento de onda de 640 nm.

4.3.8 Análise Estatística

As médias dos valores dos grupos controle e tratado com FH foram comparados entre si e analisados pelos testes de variância (ANOVA), teste de comparações múltiplas de *Tukey-Kramer* e o teste exato de *Fisher* para o teste do VIC. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

Resultados

5 RESULTADOS

Os resultados encontrados nesta pesquisa são discorridos em tópicos.

5.1 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DAS CULTURAS PRIMÁRIAS NAS CONCENTRAÇÕES 1X, 5X E 10X DOS FH NOS INTERVALOS DE 24, 48 E 72 HORAS

Após a obtenção das células do parênquima hepático pela digestão com a colagenase, os hepatócitos obtidos incubados por 24 horas e mantidos em cultura apresentaram-se aderidos à placa de cultura, com núcleos binucleados. Foram obtidas várias populações de células fortemente aderidas à placa apresentando-se como células em monocamada, de forma arredondada, exibindo núcleo esférico e central, com cromatina frouxamente distribuída, evidenciando-se vários nucléolos (Figuras 18, 19 e 20). Foram observados durante o cultivo celular várias figuras de divisão celular (Figuras 21B e Figura 22), como também células diplóides com núcleos binucleados (Figura 19 B seta dupla). Raras células aderentes com forma de prolongamentos citoplasmáticos; de aspecto estrelado foram observados em várias condições de cultivo (Figura 18 B seta e Figura 21 E). Durante o crescimento e expansão celular observa-se material amorfo recém sintetizado distribuído entre as células hepáticas ou mesmo ancoradas ao fundo da placa (Figura 20 A). O citoplasma dos hepatócitos cultivados, controle e/ou tratados com os FH nas diferentes concentrações (1X, 5X e 10X) evidenciou aspecto granular, com grande densidade e refração observados à microscopia de luz invertida, (Figura 18, 19 A, 20 A e B, 21 A e B).

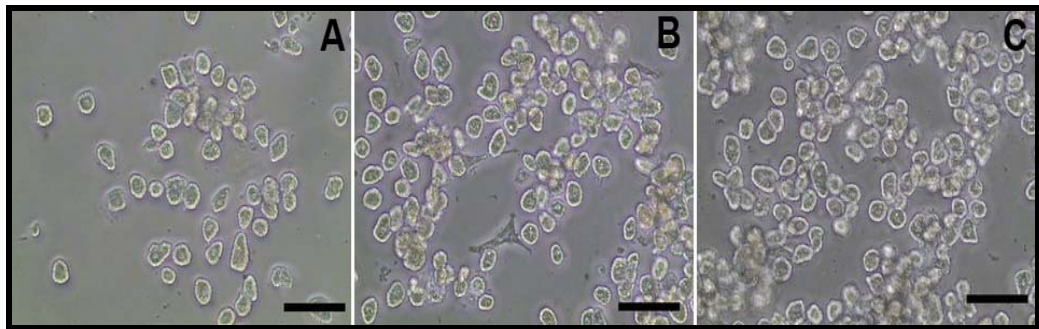


Figura 18 - (A) Cultura primária de hepatócitos na concentração 1×10^5 cel/mL; (B) cultura primária de hepatócitos na concentração $2,5 \times 10^5$ cel/mL, célula de aspecto estrelado, (seta); (C) cultura primária de hepatócitos na concentração 5×10^5 cel/mL, barra: $50 \mu\text{m}$

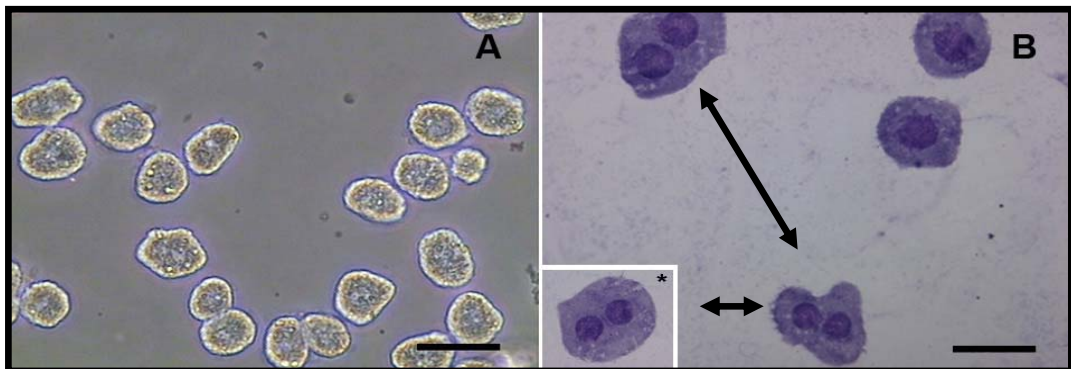


Figura 19 - (A) Cultura primária de hepatócitos, barra: $25 \mu\text{m}$, (B) Hepatócitos binucleados corados com GIEMSA, seta dupla, * detalhe do hepatócito binucleado, barra: $30 \mu\text{m}$



Figura 20 - (A) Cultura primária de hepatócitos, material amorfo (seta), barra: $25 \mu\text{m}$, (B) Cultura primária de hepatócitos, barra: $25 \mu\text{m}$

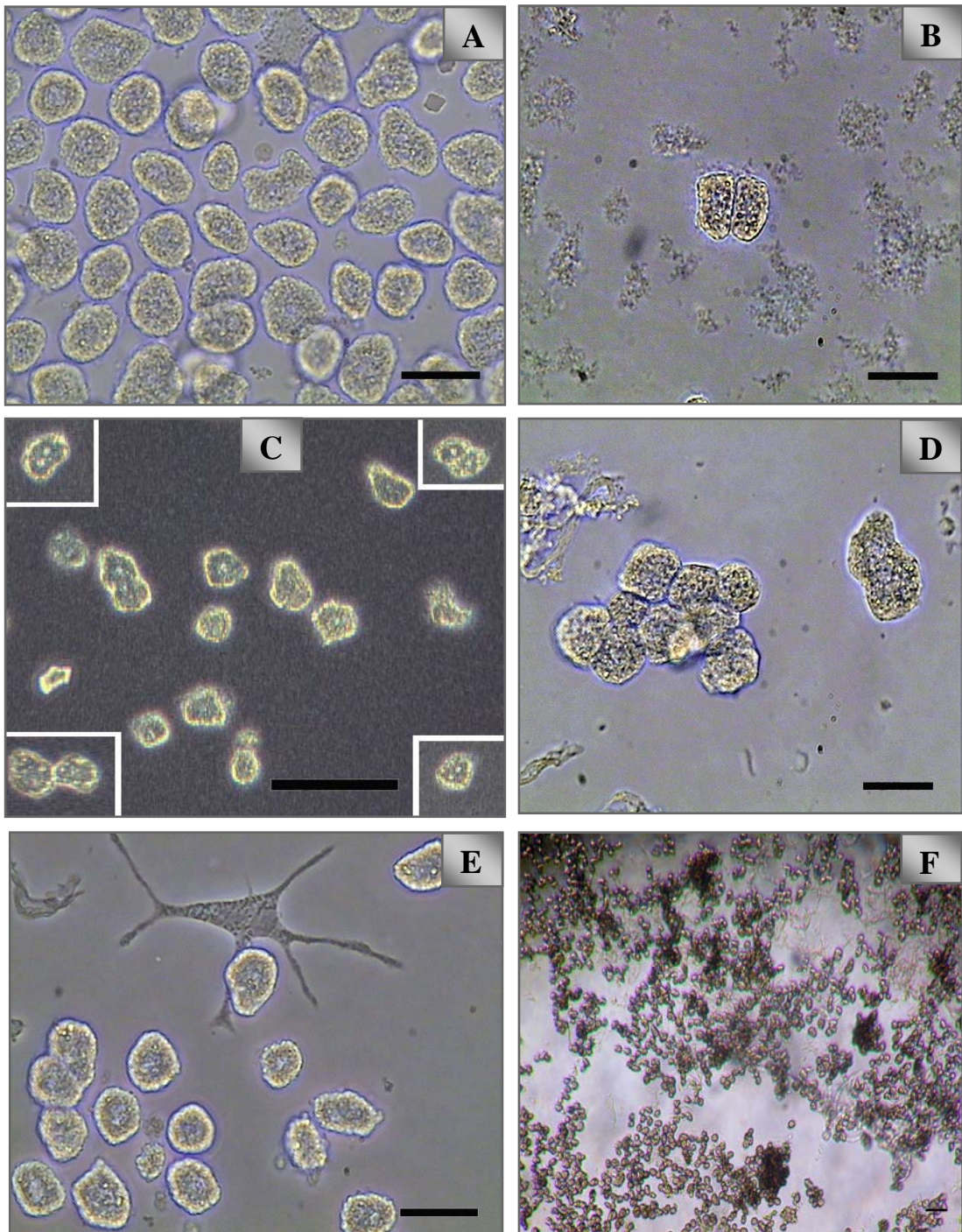


Figura 21- (A), (B), (C) Cultura primária de hepatócitos, barra: 25 μ m, (D) Cultura primária de hepatócitos, material amorfo (seta) barra: 25 μ m. (E) Cultura primária de hepatócitos, célula de aspecto estrelado (seta) barra: 25 μ m; (F) Cultura primária de hepatócitos, grumos multicelulares, barra: 25 μ m



Figura 22 - Cultura primária de hepatócitos – figura de mitose (seta) barra: 25µm

Macroscopicamente houve a formação de clones multicelulares, com possível síntese de material amorfo, sugerindo formação de matriz extracelular nos intervalos de 48 e 72 horas. As análises realizadas no período de 72 horas evidenciaram a formação de grumos multicelulares (Figura 21F).

5.2 IMUNOCITOQUÍMICA E CITOMETRIA DE FLUXO PARA AS CITOQUERATINAS 8, 18 E DESMINA

As células epiteliais são caracterizadas pela presença de grupos específicos de filamentos intermediários do citoesqueleto denominados citoqueratinas (CKs), que constituem uma complexa família com no mínimo 20 diferentes tipos de polipeptídeos expressos em vários tipos de epitélio, com sua localização intercelular variando de acordo com o estágio de desenvolvimento, tipo celular, diferenciação tecidual e alterações patológicas (CHU; WEISS, 2002). Após a fixação e permeabilização das membranas dos hepatócitos em cultura e tratados com os fatores hepatotróficos (1X, 5X e 10X), os hepatócitos mostraram-se fortemente positivos em seu citoplasma para o marcador específico citoqueratina 18 revelados por imunocitoquímica (Figuras 23 e 24). Não foram observadas diferenças quantitativas dignas de nota na expressão da

citoqueratina 18 nos hepatócitos submetidos às condições de crescimento após 24 horas na presença dos FH nas concentrações 1X, 5X e 10X (Figura 24 A, B e E), respectivamente. A marcação citoplasmática da CK 18 em hepatócitos revelou-se homogeneamente distribuída no citoplasma (Figura 24).

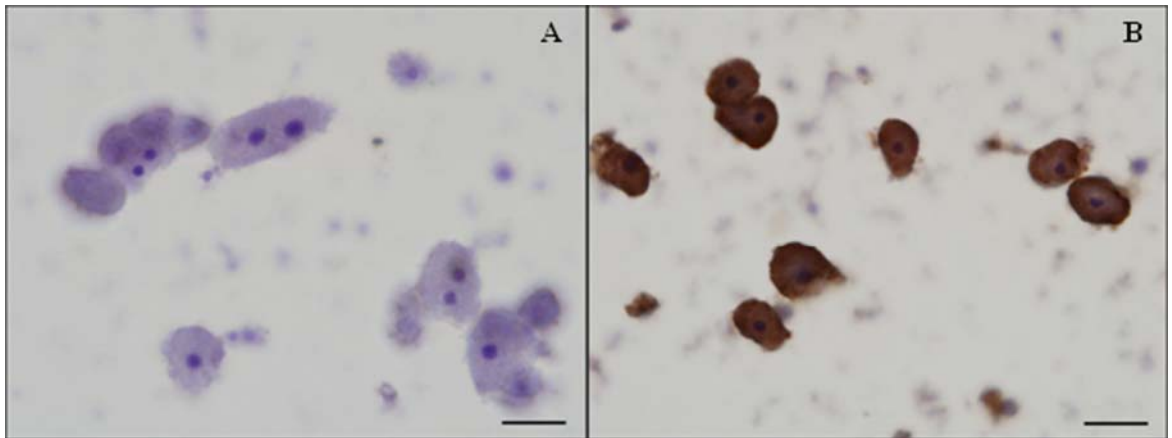


Figura 23 - Expressão da CK-18 em cultura primária de hepatócitos; (A) Controle, (B) marcação positiva barra: 10µm

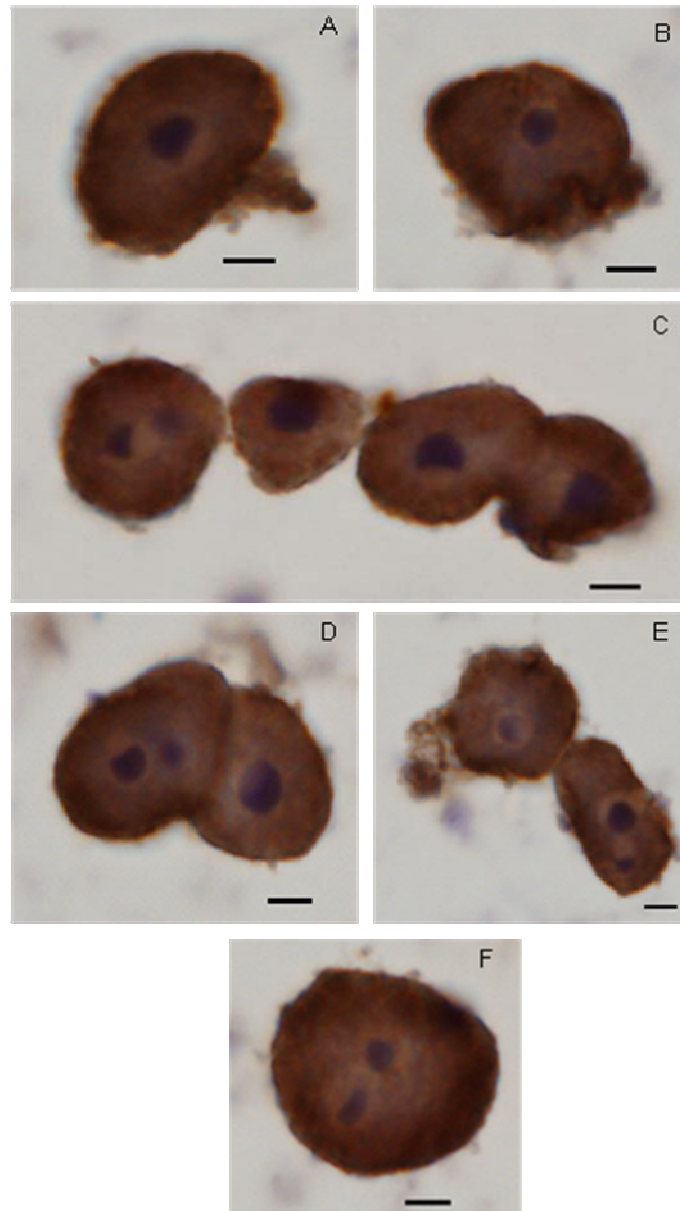


Figura 24 - Reação imunocitoquímica para CK 18 em cultura primária de hepatócitos após 24 horas barra: 5 μ m; (A, B) 1X, (C) 5X, (D, E, F) 10X

Os resultados para estes marcadores obtidos por citometria de fluxo mostraram a expressão da CK-8 e 18 em hepatócitos mantidos em cultura por 24 e 72 horas na presença e na ausência dos FH foi diferentemente distribuída após a adição dos FH nas concentrações de 1X e 10X, como apresentados nos histogramas da aquisição no programa *Cell Quest*® e nos gráficos de barras 1, 2, 3, 4 e 5. Por outro lado, a expressão da desmina mostrou-se em menor proporção que os outros marcadores do citoesqueleto, que foi significativamente diminuído na ausência do FH

(S/FH 24 horas) e aumentando a sua expressão nos grupos tratados 24 horas. Os valores obtidos de expressão da desmina após 72 horas mostraram que a condição de tratamento com FH na concentração de 10X manteve níveis semelhantes que a condição inicial de tratamento. Os histogramas de aquisição pelo programa *Cell Quest®* e as médias e desvio padrão dos diferentes grupos experimentais estão apresentados nos gráficos 5, 6 e tabela 2.

Tabela 2 - Expressão dos marcadores de citoesqueleto citoqueratinas 8, 18 e desmina, em cultura primária de hepatócitos mantidos por 24 e 72 horas após a adição de fatores hepatotróficos (FH) nas concentrações 1X e 10X por citometria de fluxo

Tratamento/tempo (n=03)	CK8 X ± DP	CK18 X ± DP	Desmina X ± DP
T0	71,0 ± 2,3	61,4 ± 0,5	25,8 ± 2,4
S/FH 24 h	59,4 ± 7,6	48,6 ± 1,9	3,2 ± 0,6
FH1X 24h	53,4 ± 1,0	54,0 ± 0,5	12,3 ± 1,9
FH10X 24h	55,0 ± 0,9	51,2 ± 1,6	12,7 ± 1,9
S/FH 72h	41,1 ± 3,5	37,3 ± 2,2	18,7 ± 0,02
FH1X 72h	59,0 ± 7,1	71,9 ± 0,9	1,3 ± 0,02
FH10X 72h	36,4 ± 0,9	37,8 ± 0,1	15,2 ± 1,6

X: média

DP: desvio padrão

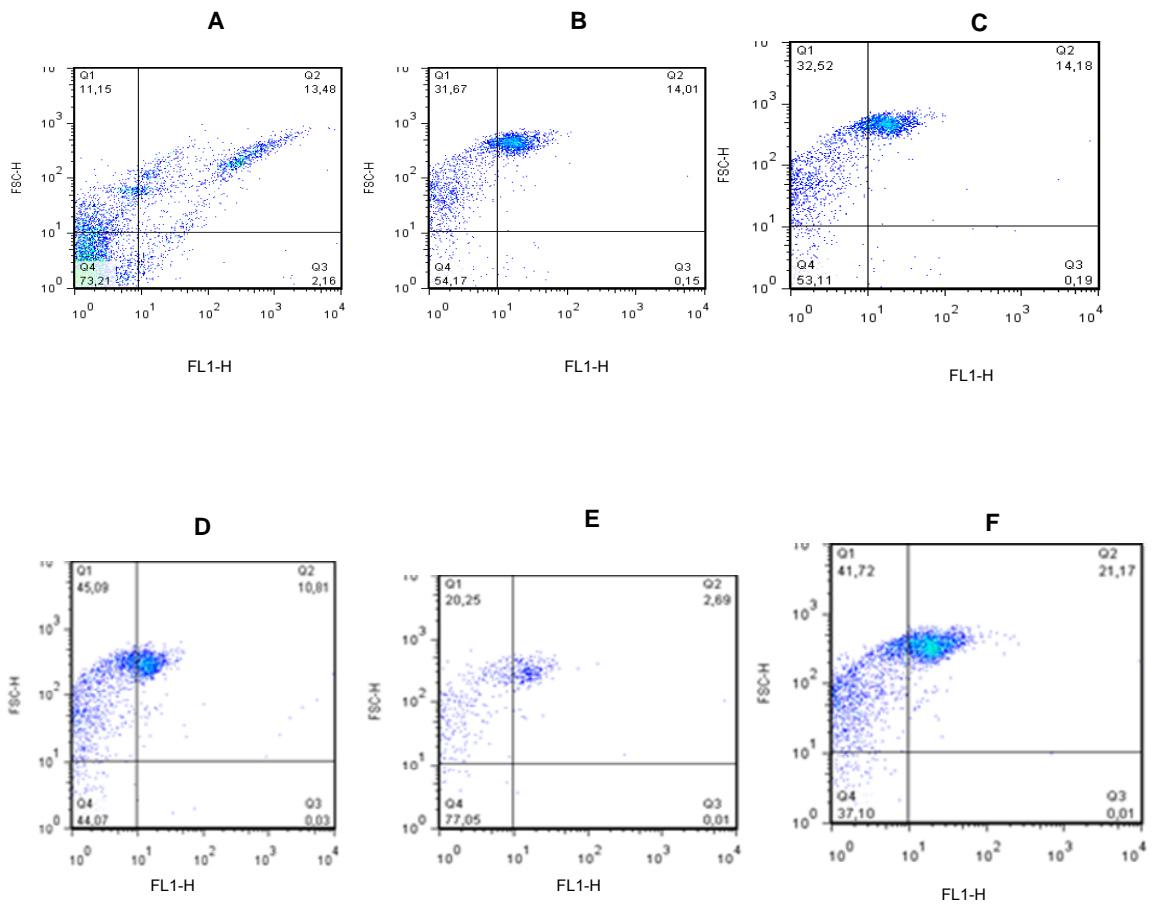
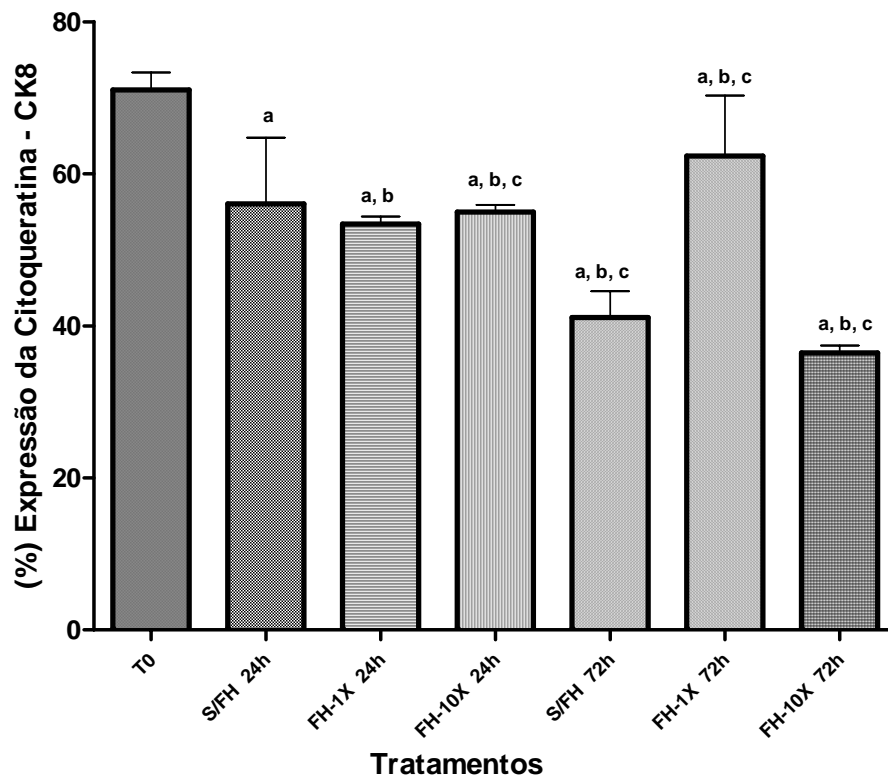


Gráfico 1 - Expressão da citoqueratina 8. *Dot plot* adquirido pelo programa *Cell Quest®* e analisado pelo programa *FlowJo®*. Em (A) T0-24h, (B) FH-1X 24h, (C) FH-10X 24h, (D) T0-72h, (E) FH-1X 72h e (F) FH-10X 72h



- a: diferenças estatísticas entre os tempos de cultivo T0 e a presença ou ausência dos fatores hepatotróficos 1X e 10X, após 24 e 72 horas de cultivo;
- b: diferenças estatísticas entre os tempos de cultivo S/FH 24h e a presença ou ausência dos fatores hepatotróficos 1X e 10X, após 24 e 72 horas de cultivo e
- c: diferenças estatísticas entre os tempos de cultivo FH-1X 24h e a presença ou ausência dos fatores hepatotróficos 1X e 10X, após 24 e 72 horas de cultivo.

Gráfico 2 - Gráfico de barra das médias \pm DP da expressão da citoqueratina 8-CK8 da população de hepatócitos da cultura primária, após 24 e 72 horas de tratamento, na presença ou ausência de fatores hepatotróficos (FH) nas concentrações 1X e 10X. N= 3 experimentos independentes. Teste de comparações múltiplas Tukey- Kramer

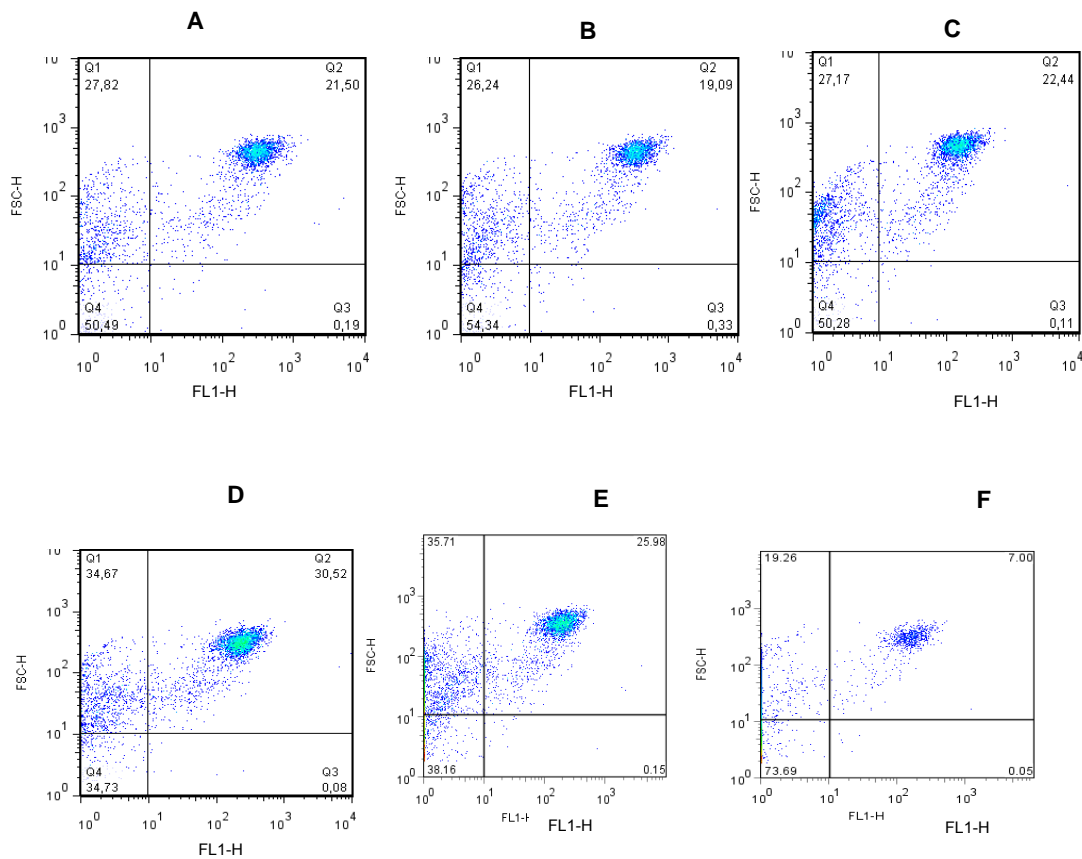
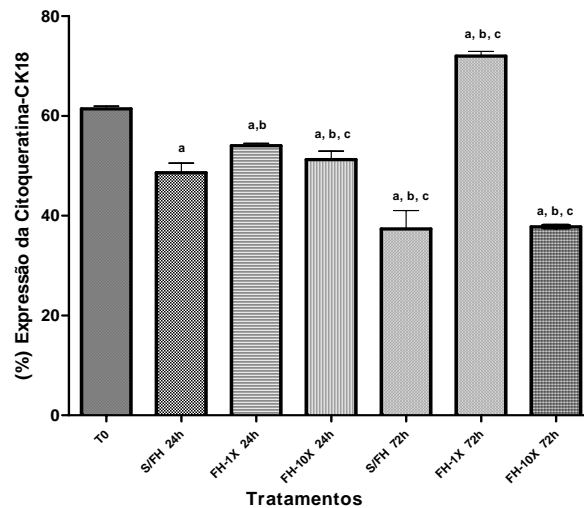


Gráfico 3 – Expressão da citoqueratina 18 – CK18. Dot Plot adquirido pelo programa Cell Quest® e analisado pelo programa FlowJo®. Em (A) T0-24h, (B) FH-1X 24h (C) FH-10X 24h, (D) T0-72h, (E) FH-1X 72h e (F) FH-10X 72h



- a: diferenças estatísticas entre os tempos de cultivo T0 e a presença ou ausência dos fatores hepatotróficos 1X e 10X, após 24 e 72 horas de cultivo;
- b: diferenças estatísticas entre os tempos de cultivo S/FH 24h e a presença ou ausência dos fatores hepatotróficos 1X e 10X, após 24 e 72 horas de cultivo; e
- c: diferenças estatísticas entre os tempos de cultivo FH-1X 24h e a presença ou ausência dos fatores hepatotróficos 1X e 10X, após 24 e 72 horas de cultivo.

Gráfico 4 - Gráfico de barra das médias \pm DP da expressão da citoqueratina 18–CK18 em hepatócitos de cultura primária, após 24 e 72 horas de tratamento, na presença ou ausência de fatores hepatotróficos (FH) nas concentrações 1X e 10X. N= 3 experimentos independentes. Teste de comparações múltiplas Tukey- Kramer

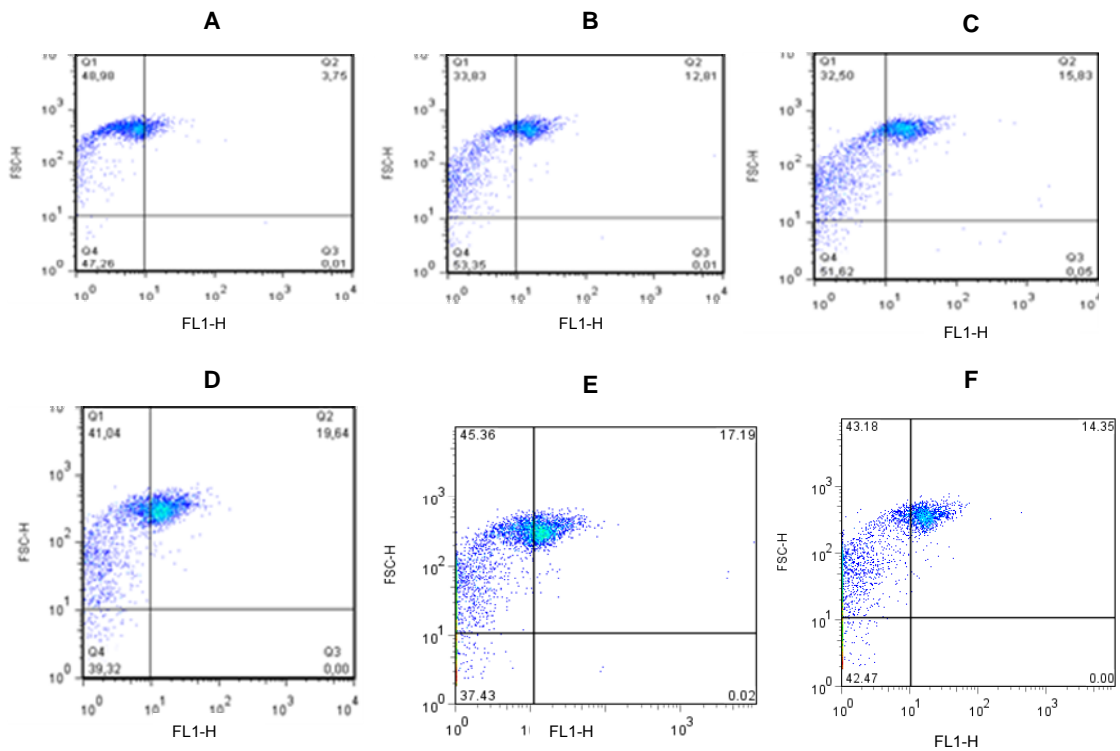
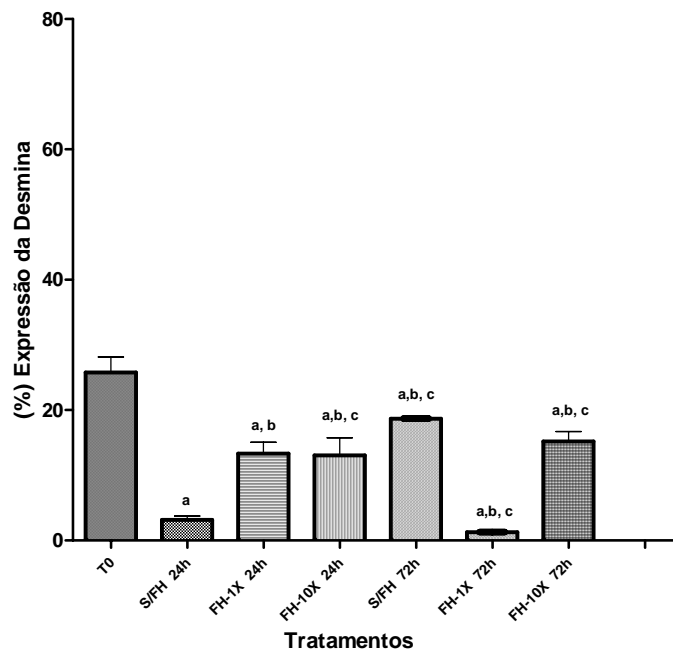


Gráfico 5- Expressão da desmina. *Dot Plot* adquirido pelo programa Cell Quest® e analisado pelo programa FlowJo®. Em (A) T0-24h, (B) FH-1X 24h, (C) FH -10X 24h, (D) T0-72h, (E) FH-1X 72h e (F) FH-10X 72h

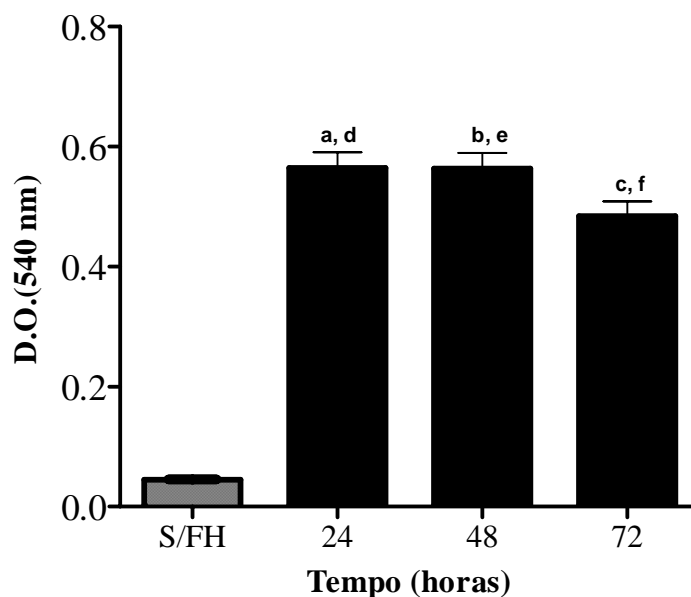


- a: diferenças estatísticas entre os tempos de cultivo T0 e a presença ou ausência dos fatores hepatotróficos 1X e 10X, após 24 e 72 horas de cultivo;
- b: diferenças estatísticas entre os tempos de cultivo S/FH 24h e a presença ou ausência dos fatores hepatotróficos 1X e 10X, após 24 e 72 horas de cultivo; e
- c: diferenças estatísticas entre os tempos de cultivo FH-1X 24h e a presença ou ausência dos fatores hepatotróficos 1X e 10X, após 24 e 72 horas de cultivo.

Gráfico 6 - Gráfico de barra das médias ± DP da expressão da desmina em hepatócitos de cultura primária, após 24 e 72 horas de tratamento, na presença ou ausência de fatores hepatotróficos (FH) nas concentrações 1X e 10X. N= 3 experimentos independentes. Teste de comparações múltiplas Tukey- Kramer

5.3 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO – MTT E CITOTOXIDADE EM CITOMETRIA DE FLUXO

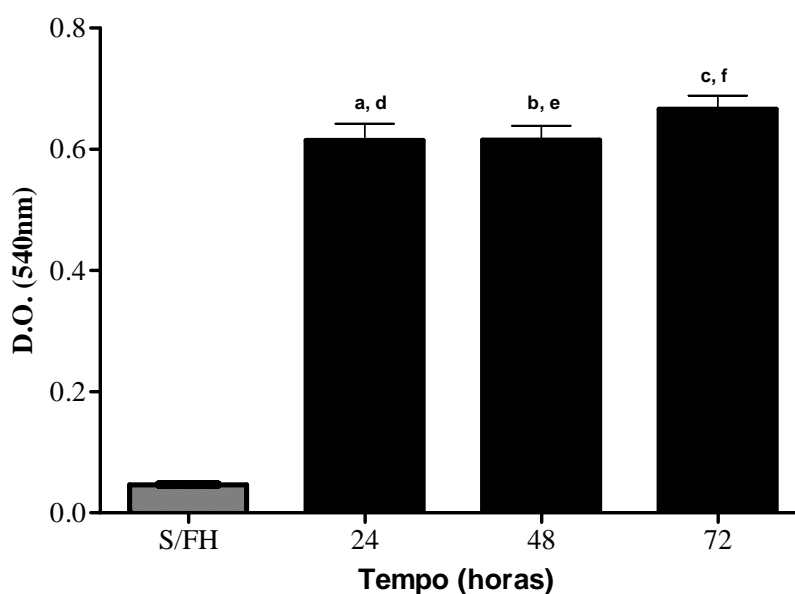
A adição dos FH na concentração de 1X na cultura primária de hepatócitos nos três períodos de tratamento aumentou significativamente a proliferação de hepatócitos, em comparação ao grupo sem adição de fatores hepatotróficos (S/FH). A proliferação de hepatócitos nos períodos de 24 e 48 horas foi igual. Houve diferenças estatísticas nos períodos entre 24 e 72 horas e 48 e 72 horas ($p < 0,001$) (Gráfico 7). O aumento da resposta proliferativa nos períodos de 24 e 48 horas foi em média 12,4 vezes, e no período de 72 horas o aumento foi de 10,6 vezes em relação ao controle.



a: diferenças estatísticas entre o grupo S/FH e a cultura de hepatócitos 24 horas;
b: diferenças estatísticas entre o grupo S/FH e a cultura de hepatócitos 48 horas;
c: diferenças estatísticas entre o grupo S/FH e a cultura de hepatócitos 72 horas;
d: ns: não foram significativas as diferenças entre 24 e 48 horas de cultivo;
e: diferenças estatísticas entre 24 e 72 horas de cultivo;
f: diferenças estatísticas entre 48 e 72 horas de cultivo.
Teste de Variância ANOVA

Gráfico 7 - Gráficos de barra representativos das médias \pm DP do teste colorimétrico MTT para a avaliação da capacidade proliferativa da cultura primária de hepatócitos, após a adição dos fatores hepatotróficos na concentração de 1X. Experimentos independentes realizados em octoplicatas, $n=6$

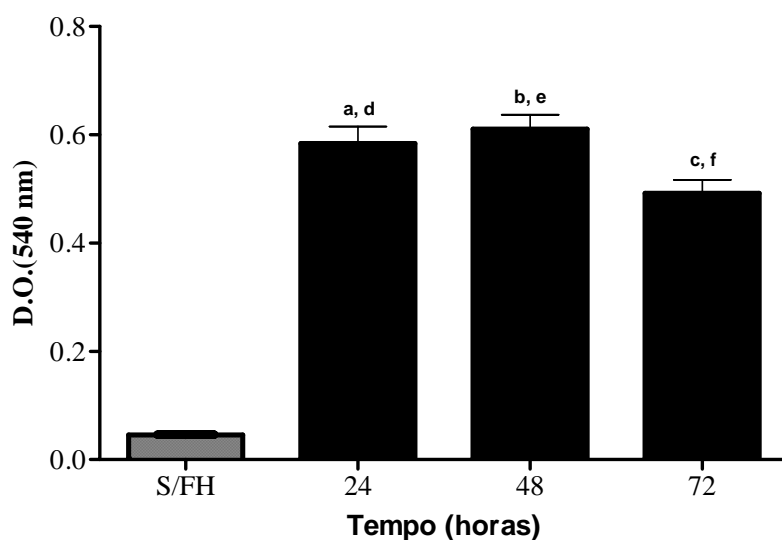
A adição dos FH na concentração 5X na cultura primária de hepatócitos nos três períodos de tratamento aumentou significativamente ($p < 0,001$) a proliferação de hepatócitos, em comparação ao grupo sem adição dos fatores hepatotróficos (FH). A proliferação de hepatócitos no período de 24 e 48 horas foi igual. A proliferação de hepatócitos no período de 72 horas foi maior ($p < 0,001$). Ocorreram diferenças estatísticas entre os períodos de 24 e 72 horas e entre 48 e 72 horas ($p < 0,001$). Os cálculos estatísticos e as comparações entre os grupos controle e os tratados com FH nos diferentes períodos de cultivo estão apresentados no gráfico 8.



a: diferenças estatísticas entre o grupo S/FH e a cultura de hepatócitos 24 horas;
b: diferenças estatísticas entre o grupo S/FH e a cultura de hepatócitos 48 horas;
c: diferenças estatísticas entre o grupo S/FH e a cultura de hepatócitos 72 horas;
d: não foram significativas as diferenças entre 24 e 48 horas de cultivo;
e: não houve diferença estatísticas entre 24 e 72 horas de cultivo;
f: diferenças estatísticas entre 48 e 72 horas de cultivo.
Teste de Variância ANOVA

Gráfico 8 - Gráficos de barra representativos das médias \pm DP do teste colorimétrico MTT para a avaliação da capacidade proliferativa da cultura primária de hepatócitos, após a adição dos fatores hepatotróficos na concentração de 5X. Experimentos independentes realizados em octoplicatas, $n=6$

A adição dos FH na concentração 10X na cultura primária de hepatócitos, nos três períodos de tratamento aumentou significativamente ($p < 0,001$) a proliferação de hepatócitos, em comparação ao grupo sem adição dos fatores hepatotróficos (S/FH). Não houve diferença estatística entre a proliferação de hepatócitos no período de 24 e 48 horas, havendo apenas diferença estatística entre 24 e 72 horas e 48 e 72 horas ($p < 0,001$) gráfico 9 e tabela 3.



a: diferenças estatísticas entre o grupo S/FH e a cultura de hepatócitos 24 horas;
 b: diferenças estatísticas entre o grupo S/FH e a cultura de hepatócitos 48 horas;
 c: diferenças estatísticas entre o grupo S/FH e a cultura de hepatócitos 72 horas;
 d: não foram significativas as diferenças entre 24 e 48 horas de cultivo;
 e: diferenças estatísticas entre 24 e 72 horas de cultivo;
 f: diferenças estatísticas entre 48 e 72 horas de cultivo.
 Teste de Variância ANOVA

Gráfico 9 - Gráficos de barra representativos das médias \pm DP do teste colorimétrico MTT para a avaliação da capacidade proliferativa da cultura primária de hepatócitos, após a adição dos fatores hepatotróficos na concentração de 10X. Experimentos independentes realizados em octoplicatas, n=6

Tabela 3 - Análise da viabilidade das culturas primárias de hepatócitos tratadas com as concentrações de 1X, 5X e 10X dos FH, nos diferentes períodos e analisadas pelo método colorimétrico – MTT

Viabilidade Celular (%)			
Fatores Hepatrotóxicos			
Tempo (h)	1X	5X	10X
24	90 \pm 1,8	90 \pm 1,4	90 \pm 1,2
48	90 \pm 1,3	88 \pm 1,7	93 \pm 1,8
72	92 \pm 1,6	93 \pm 2,1	89 \pm 1,7

5.3.1 Efeitos citotóxicos e proliferativos dos fatores hepatotróficos (FH) em culturas primárias de hepatócitos

Os efeitos dos FH sobre a viabilidade celular foram avaliados pelo teste colorimétrico - MTT. Os FH não demonstraram toxicidade em cultura primária de

hepatócitos de ratos em nenhuma das concentrações avaliadas ao longo de todos os períodos experimentais de 24, 48 e 72 horas. Neste tempo de exposição/tratamento, a viabilidade percentual expressa em relação ao controle manteve-se acima de 90% (Tabela 4). A análise da viabilidade celular após 72 horas de tratamento dos FH também não evidenciou toxicidade significativa. Foi observado, após 24, 48 e 72 horas de tratamento, que os FH não foram capazes de induzir uma citotoxicidade precoce em hepatócitos, não sendo verificada qualquer alteração na atividade das desidrogenases mitocondriais dessas células, mesmo na concentração de 10X. A adição dos fatores hepatotróficos na concentração 1X, após 24 e 48 horas aumentou a proliferação dos hepatócitos em média 4X. Contudo, nas concentrações 1X e 10X após 72 horas a proliferação de hepatócitos foi menor. Não houve modificações quantitativas expressivas nas concentrações de 5X e 10X. Houve a formação de clones multicelulares com possível síntese de material amorfo, sugerindo a formação de matriz extracelular nos intervalos de 48 e 72 horas (Figura 21 D e F). As análises estatísticas comparativas entre os períodos de 24, 48 e 72 horas após a adição da solução de FH nas concentrações de 1X, 5X e 10X estão apresentados no anexo B. Todos os resultados obtidos pela metodologia colorimétrica do MTT foram confirmados pela integridade da membrana celular dos hepatócitos mantidos em cultura por 24 e 72 horas por citometria de fluxo pela difusão do fluorocromo iodeto de propídeo PI. As análises realizadas por esta metodologia mostraram semelhanças no porcentual de células viáveis àquelas adquiridas pelo MTT. Os histogramas representativos estão representados na gráficos 10 e 11 e as médias e desvio padrão de cada tratamento apresentados no gráfico 11 e tabela 4.

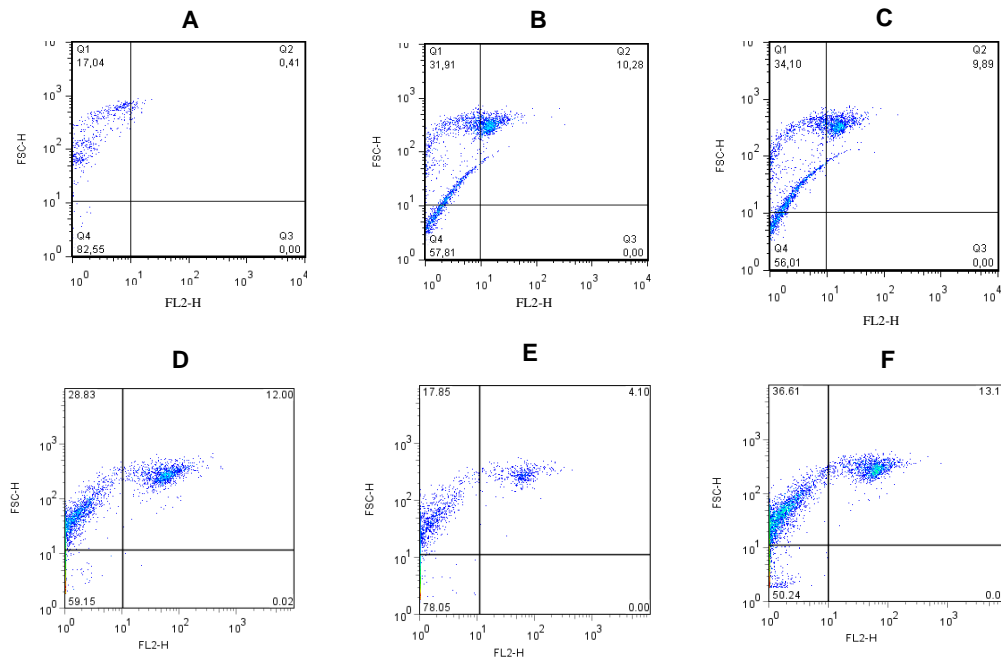


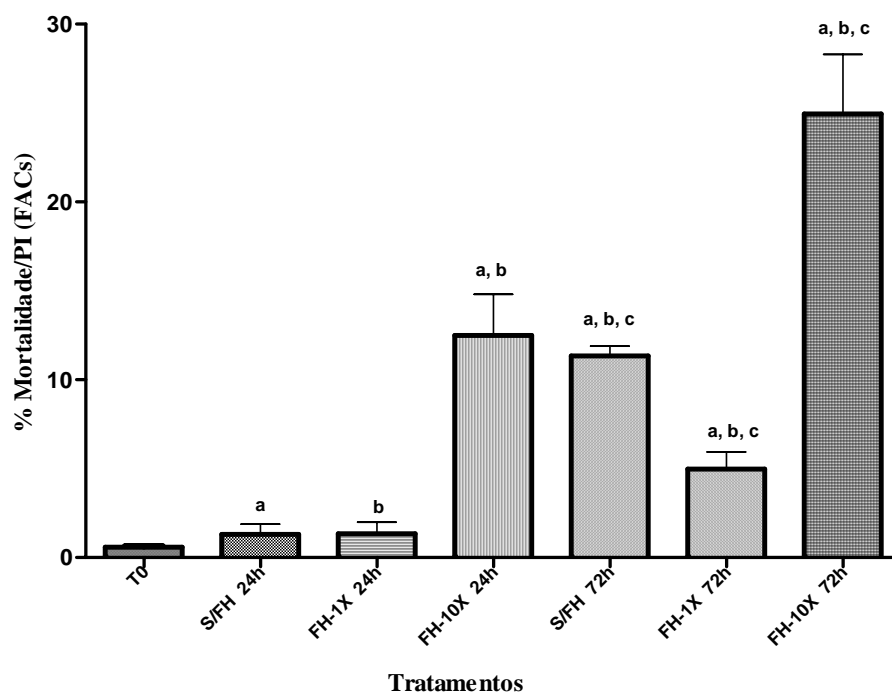
Gráfico 10 - Histograma representativo da viabilidade celular pelo método de difusão do iodeto de propídeo (PI) pela membrana celular de hepatócitos. Em (A) T0-24h, (B) FH-1X 24h, (C) FH-10X 24h, (D) T0-72h, (E) FH-1X 72h e (F) FH-10X 72h

Tabela 4 - Análise da viabilidade celular pelo método de difusão do iodeto de propídeo (PI) pela membrana celular de hepatócitos mantidos em cultura primária por 24 e 72 horas após a adição de FH nas concentrações 1X e 10X por citometria de fluxo

Tratamento/tempo (n=3)	Mortalidade $X \pm DP$
T0	$0,6 \pm 0,0$
S/FH 24 h	$1,3 \pm 0,6$
FH1X 24h	$1,3 \pm 0,6$
FH10X 24h	$12,5 \pm 2,3$
S/FH 72h	$11,3 \pm 0,6$
FH1X 72h	$5,0 \pm 0,9$
FH10X 72h	$24,9 \pm 3,3$

X: média

DP: desvio padrão



- Tratamentos**
- a: diferenças estatísticas entre os tempos de cultivo T0 e a presença ou ausência dos fatores hepatotróficos 1X e 10X, após 24 e 72 horas de cultivo;
 - b: diferenças estatísticas entre os tempos de cultivo S/FH 24h e a presença ou ausência dos fatores hepatotróficos 1X e 10X, após 24 e 72 horas de cultivo; e
 - c: diferenças estatísticas entre os tempos de cultivo FH-1X 24h e a presença ou ausência dos fatores hepatotróficos 1X e 10X, após 24 e 72 horas de cultivo.

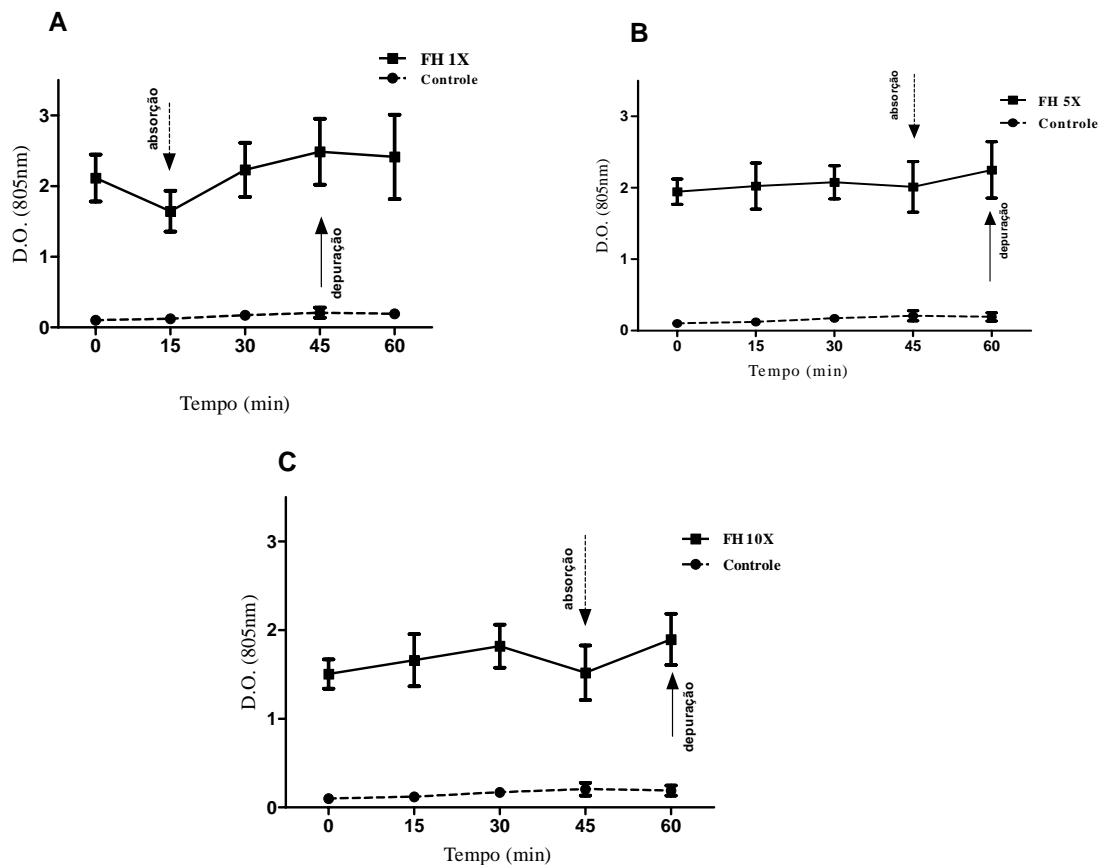
Gráfico 11 - Gráfico de barra representativo das médias \pm DP da viabilidade celular pelo método de difusão do iodeto de propídeo (PI) pela membrana celular de hepatócitos, mantidos em cultura primária por 24 e 72 horas, após adição de FH nas concentrações 1X e 10X. Experimentos independentes realizados em triplicata. Teste de múltiplas comparações Tukey-Kramer

5.4 A CAPACIDADE DE METABOLIZAÇÃO HEPÁTICA DO VERDE DE INDOCIANINA

A capacidade de absorção/eliminação do corante VIC foi avaliada nas culturas primárias de hepatócitos. Os resultados apresentados na gráfico 12 (A) mostraram a absorção parcial do VIC pelos hepatócitos nos intervalos de 0 e 15 minutos e após tratamento com os FH na concentração de 1X no período de 24 horas de cultivo.

Os resultados obtidos no tratamento com os FH na concentração de 5X mostraram que, a absorção parcial do VIC metabolizado pela cultura primária de

hepatócitos após 30 minutos e sendo parcialmente eliminado após 60 minutos no intervalo de 24 horas (Gráfico 12 B). Após 24 horas na concentração de 5X o percentual de absorção e eliminação foi significativamente menor, quando comparado às concentrações de 1X. O perfil de excreção do VIC absorvido mostrou ponto de declínio (Gráfico 12 C) quando comparado à concentração de 5X dos FH no mesmo período.



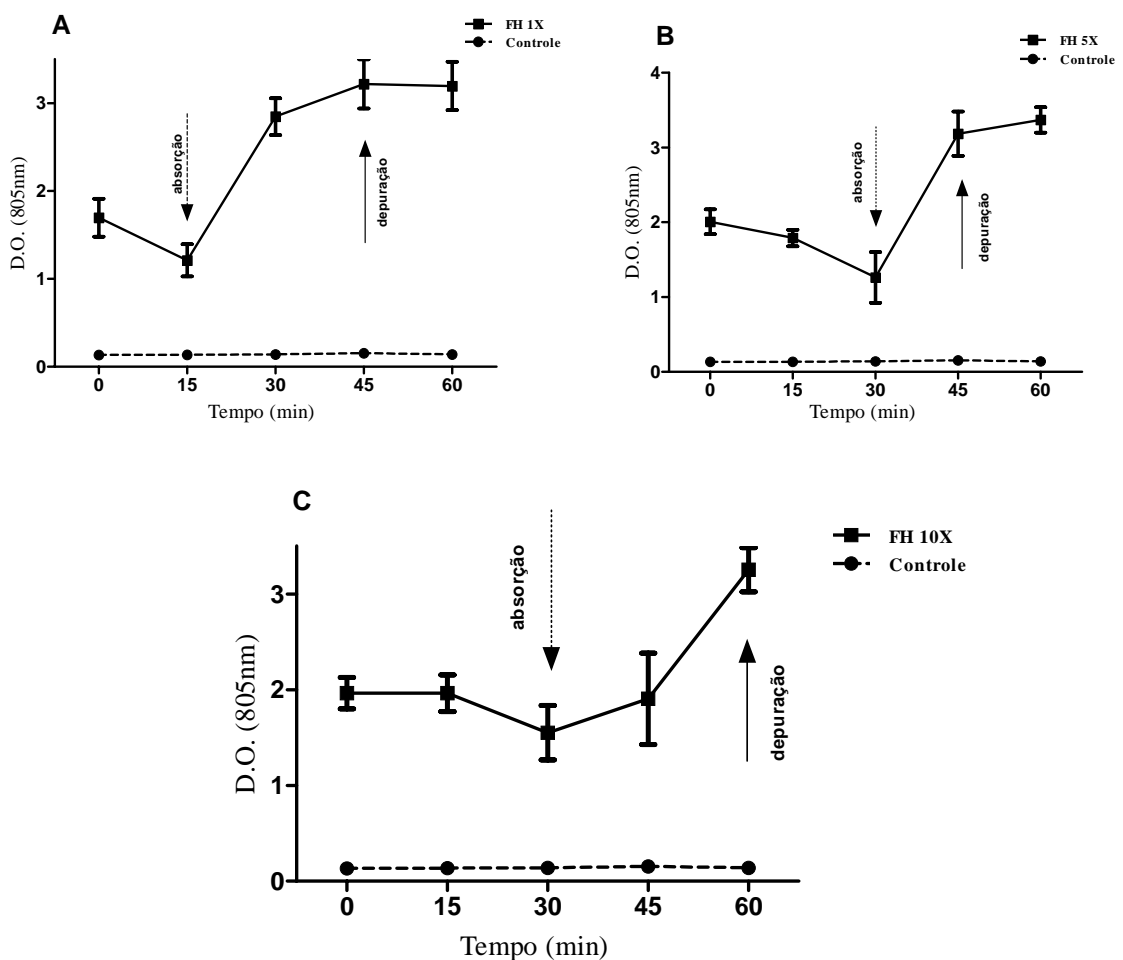
ns= $p > 0,05$ Teste de Fisher, seguido de Kruskal Wallis

Gráfico 12 - Cinética da absorção/eliminação em função do tempo do corante verde de indocianina (VIC) em cultura primária de hepatócitos, após a adição dos FH, (A) concentração de 1X, (B) 5X e (C) 10X durante 24 horas de cultivo

A curva de absorção e eliminação obtida da cultura primária de hepatócitos com VIC após adição dos FH na concentração 1X após 48 horas mostrou absorção acentuada após 15 minutos, tendo seu platô de depuração após 60 minutos (Gráfico 13 A).

Nas condições de tratamento com os FH na concentração de 5X a absorção da VIC pela cultura primária de hepatócitos foi realizada em maior proporção nos intervalos de 15 a 30 minutos com eliminação passiva após 45 minutos (Gráfico 13 B).

Nas condições de cultura primária de hepatócitos com a adição dos FH na concentração de 10X, os resultados obtidos mostraram o prolongamento do intervalo de absorção 15 minutos e a depuração total da VIC após 60 minutos (Gráfico 13 C).



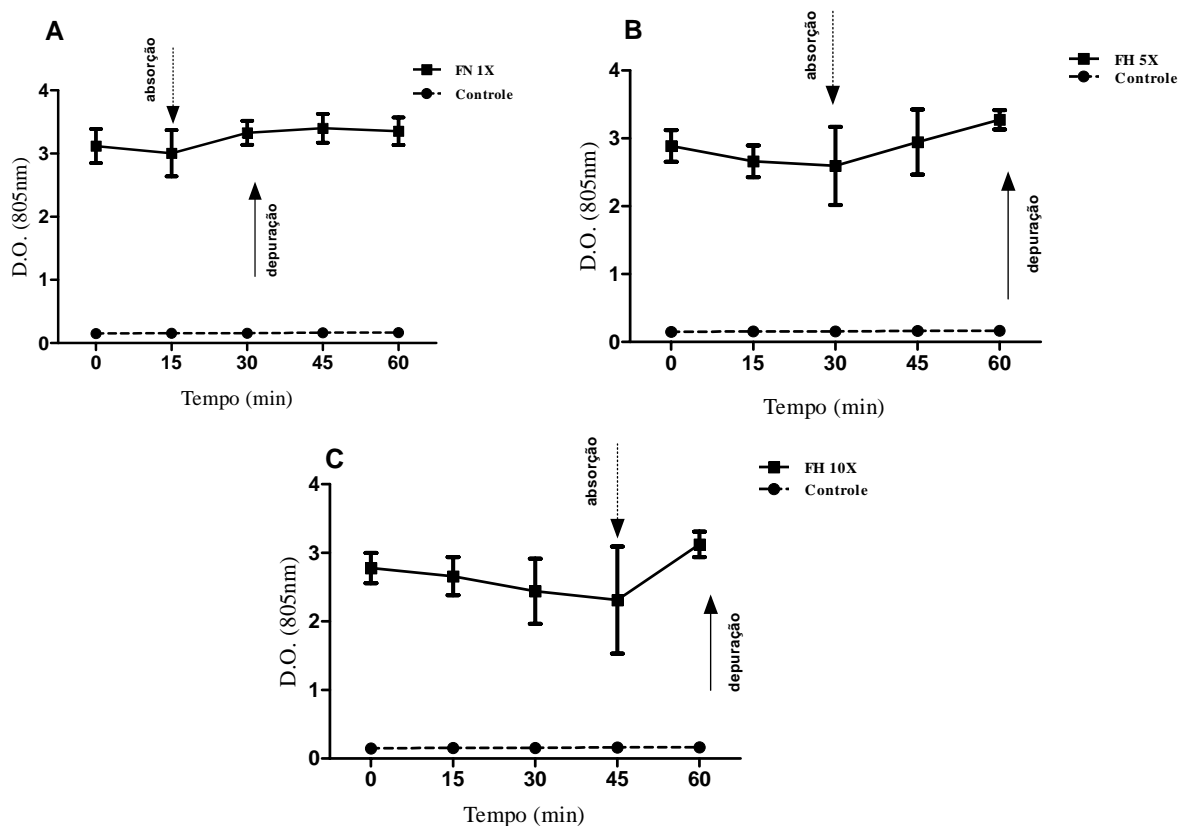
ns= $p > 0,05$ Teste de Fisher, seguido de Kruskal Wallis

Gráfico 13 - Cinética da absorção/eliminação em função do tempo do corante verde de indocianina (VIC) em cultura primária de hepatócitos, após a adição dos FH (A) concentração de 1X, (B) 5X e (C) 10X, durante 48 horas de cultivo

Após 72 horas da adição dos FH na concentração de 1X na cultura primária de hepatócitos, estes apresentaram eliminação completa do corante verde de indocianina (VIC) até 60 minutos do período analisado (Gráfico 14 A).

Na concentração de 5X dos FH o teste de absorção do corante VIC mostrou uma re-distribuição do perfil de absorção e eliminação deste corante. Após 30 minutos ocorreu nova absorção pequena, porém expressiva do VIC, que foi lentamente eliminado até 60 minutos (Gráfico 14 B).

No período de 72 horas os resultados seguem os mesmos padrões que descritos anteriormente, porém com extensão do período de captação da VIC até 45 minutos (Gráfico 14 C).

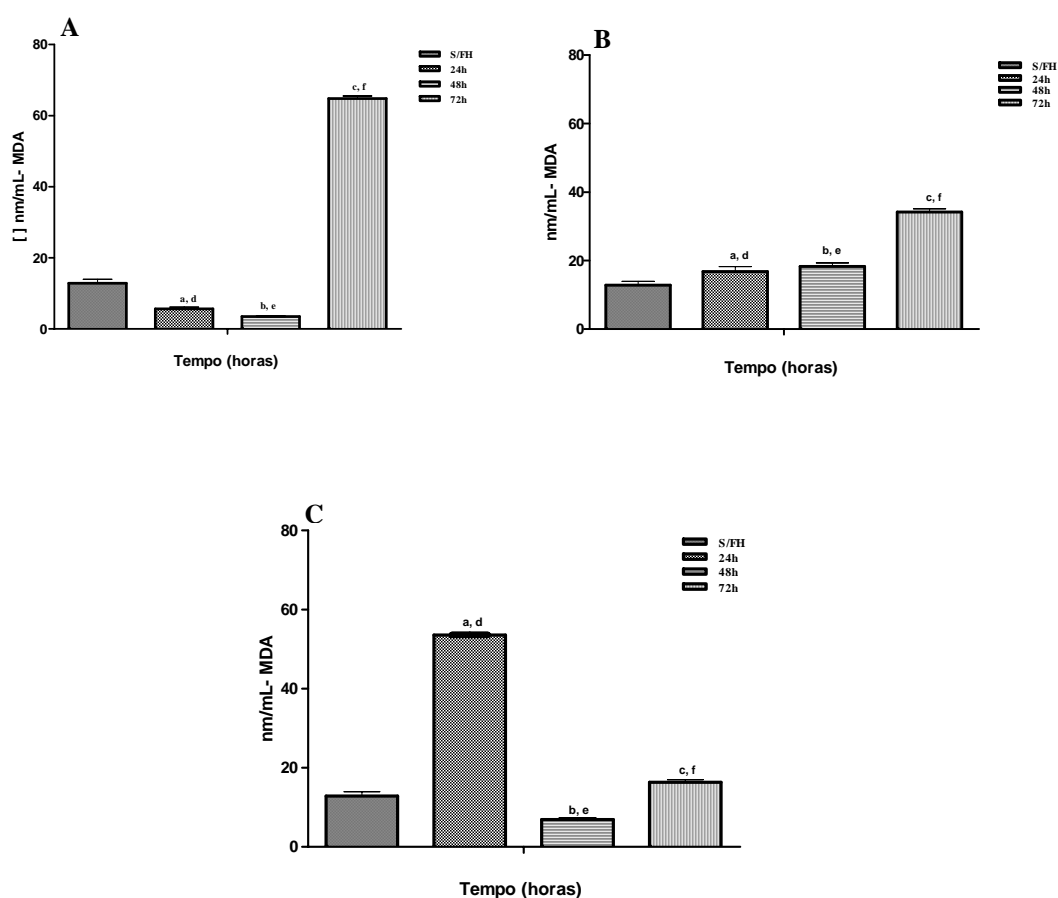


ns= $p > 0,05$ Teste de Fisher, seguido de Kruskal Wallis

Gráfico 14 - Cinética da absorção/eliminação em função do tempo do corante verde de indocianina (VIC) em cultura primária de hepatócitos, após a adição dos FH, (A) na concentração de 1X, (B) 5X e (C) 10X, durante 72 horas de cultivo

5.5 DETERMINAÇÃO DA FORMAÇÃO DE PERÓXIDOS LIPÍDICOS POLIINSATURADOS DO SOBRENADANTE DA CULTURA DE HEPATÓCITOS

Os FH adicionados nas culturas primárias de hepatócitos, nas concentrações 1X, 5X e 10X e avaliados após 24, 48 e 72h mostraram diversidade nos resultados (Gráfico 15).



a: diferenças estatísticas entre o grupo S/FH e a cultura de hepatócitos 24horas;
 b: diferenças estatísticas entre o grupo S/FH e a cultura de hepatócitos 48horas;
 c: diferenças estatísticas entre o grupo S/FH e a cultura de hepatócitos 72horas;
 d: diferenças entre 24 vs 48 horas de cultivo;
 e: diferenças estatísticas entre 24 vs 72 horas de cultivo;
 f: diferenças estatísticas entre 48 e 72 horas de cultivo.

Teste de Variância ANOVA

Gráfico 15 - Determinação da concentração do reativo de TBARS (expressos em nmol/mL) em sobrenadante de cultura de hepatócitos após adição dos FH, (A) na concentração de 1 X, (B) 5X e (C) 10X, nos diferentes períodos de cultivo

Os fatores hepatotróficos na concentração de 1X, adicionados às culturas primárias de hepatócitos nos períodos de 24 e 48 horas inibiram a formação de radicais livres, derivadas do ácido tiobarbitúrico (0,94 e 3,48nmol/mL, respectivamente (Gráfico 15 A e B).

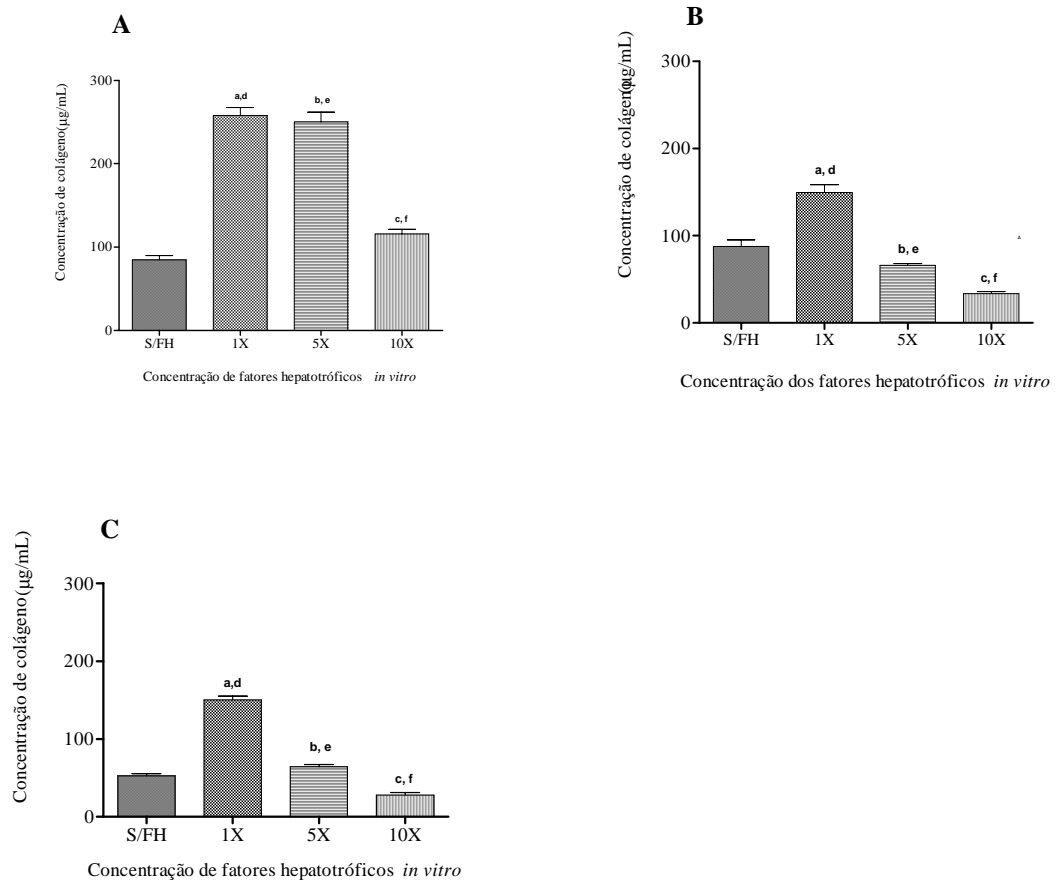
Após 72 horas de cultura houve aumento significativo ($p < 0,001$) destes radicais livres, quando comparado ao controle (S/FH) (Gráfico 15 A).

As culturas primárias de hepatócitos quando tratadas com os fatores hepatotróficos na concentração de 5X nos períodos de 24 e 48 horas inibiram a formação de radicais livres reativos do ácido tiobarbitúrico, protegendo de maneira significativa a membrana celular da peroxidação lipídica. No período de 72 horas a produção de radicais livres foi significativamente menor que o grupo controle (S/FH).

Os hepatócitos quando tratados com os fatores hepatotróficos na concentração de 10X no período de 24 horas levou a formação de radicais livres, e somente nos períodos de 48 e 72 horas houve a inibição da formação destes radicais lipídicos, quando comparado ao controle (S/FH) (Gráfico 15 C).

5.6 QUANTIFICAÇÃO COLORIMÉTRICA DE COLÁGENO

Os resultados da quantificação de colágeno bovino (tipo I e III) nas culturas primárias de hepatócitos estão apresentados na forma de densidade ótica (D.O). A quantidade de colágeno total foi calculada a partir da equação da reta (Anexo B) obtido de concentrações conhecidas e padronizadas de colágeno tipo I .Os resultados foram expressos em $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 16 A, B e C).



- a: diferenças estatísticas entre o grupo S/FH vs concentração 1X;
 b: diferenças estatísticas entre o grupo S/FH vs concentração 5X;
 c: diferenças estatísticas entre o grupo S/FH vs concentração 10X;
 d: ns: não foram significativas as diferenças entre 24 e 48 horas de cultivo;
 e: diferenças estatísticas entre 24 e 72 horas de cultivo;
 f: diferenças estatísticas entre 48 e 72 horas de cultivo.
 Teste de Variância ANOVA

Gráfico 16 - Gráficos de barra representativos das médias \pm DP do teste do Picrosirius-red para a avaliação da produção de colágeno na cultura primária de hepatócitos, após a adição dos fatores hepatotróficos nas concentrações de 1X, 5X e 10 X, (A) 24 horas, (B) 48 horas e (C) 72 horas de cultivo. Experimentos independentes realizados em octuplicatas, n=6

A síntese e secreção de colágeno tipo I e outros tipos de colágeno produzidos pela cultura primária de hepatócitos foram avaliados pelo método colorimétrico do Picrosirius-red e mostraram que no período de 24 horas de incubação, houve aumento na síntese de colágeno, nas concentrações de 1X e 5X, quando comparado ao grupo controle (S/FH) (Gráfico 16 A). Não houve diferenças significantes entre as concentrações de 1X e 5X, entretanto na concentração de 10X houve uma diminuição, quando comparado às concentrações de 1X e 5X. Porém, a adição dos

FH na concentração de 10X induz a síntese de colágeno em menor proporção (Gráfico 16 A).

No período de 48 horas de incubação, a concentração de 1X dos FH aumentou a produção de colágeno, enquanto que as concentrações de 5X e 10X diminuíram a sua produção, (Gráfico 16 B).

No período de 72 horas de incubação, na concentração de 1X dos FH, houve aumento da produção de colágeno, enquanto que nas concentrações de 5X e 10X houve diminuição significativa, (Gráfico 16 C).

5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE APOPTÓTICA – ANEXINA V/PI

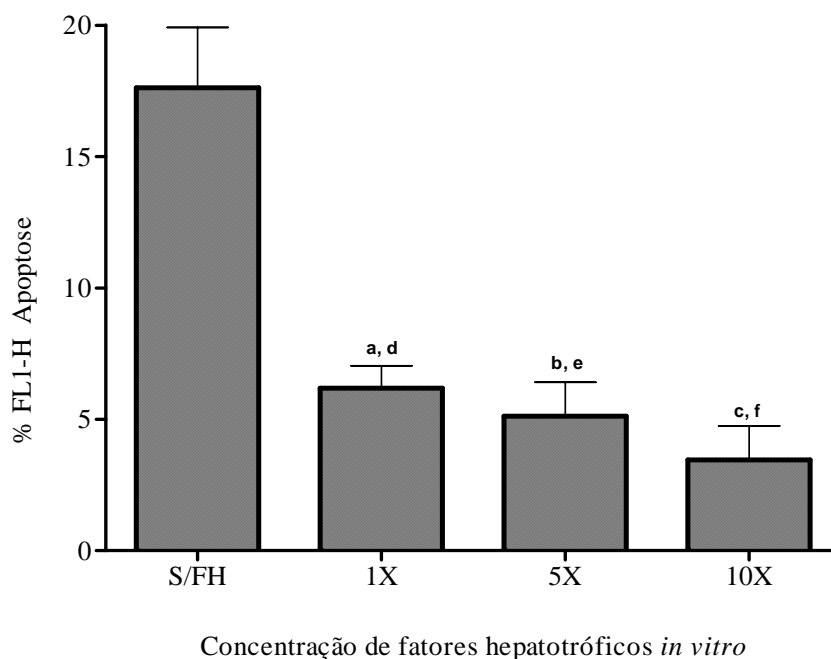
Para análise do índice de apoptose foram utilizados os parâmetros de expressão formalmente descritos: as células que expressam a fosfatidilserina na face exterior das membranas celulares se ligam a anexina-V e as células com a membrana celular comprometida permitem que o iodeto de propídio ligue-se ao ADN celular. Os hepatócitos, quando analisados imediatamente por citometria de fluxo, apresentam as seguintes populações (A) células em apoptose, (B) células mortas, (C) células viáveis não marcadas com nenhum fluorocromo e (D) células mortas por necrose (Gráfico 19). A adição das diferentes concentrações dos FH reduziu significativamente a proporção de células mortas por apoptose ($p < 0,001$), quando comparado ao controle S/FH. Em contrapartida, a proporção de células mortas por necrose aumentou significativamente ($p < 0,001$) após a adição dos FH, como também em função do aumento de sua concentração.

A cultura primária de hepatócitos não tratada com os FH (grupo controle) apresentou em média $5,6 \pm 1,1\%$ de células mortas por necrose (Anexina V/IP) e de $17,6 \pm 2,4\%$ de células em apoptose expressando o marcador para a fosfatidilserina (Anexina V) e finalmente $12,7 \pm 3,18\%$ de células mortas (Gráfico 21.)

O tratamento com as diferentes concentrações dos FH em culturas primárias de hepatócitos mostrou que a morte celular por apoptose foi menor na concentração de 10X em relação às concentrações de 1X e 5X dos FH (Gráfico 17), porém há um aumento significativo em sua citotoxicidade, como apresentado nos experimentos de MTT.

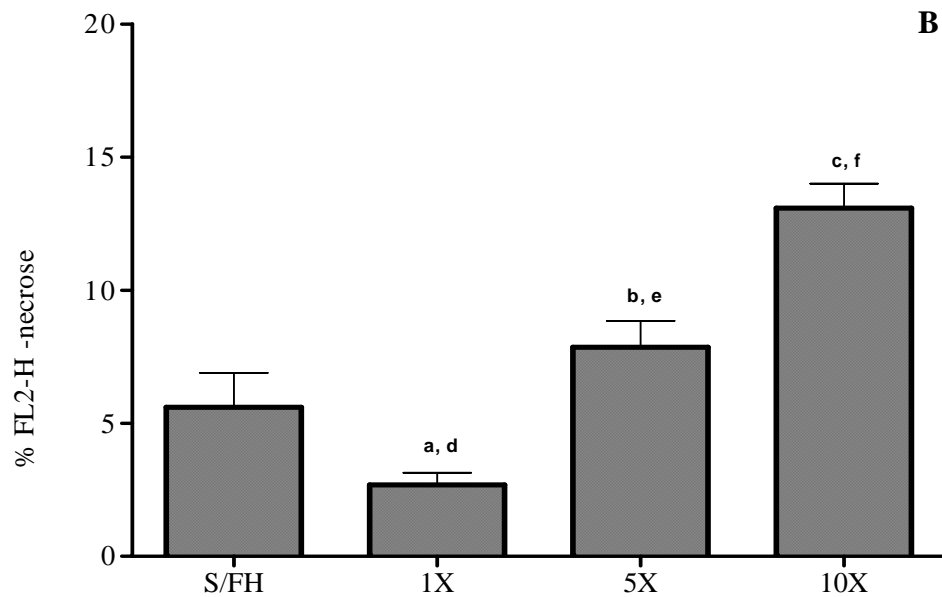
Quando analisados e comparados os tratamentos com os FH e as culturas controles S/FH observamos que a ausência dos fatores hepatotróficos induz de maneira significativa o aumento de células necróticas (Gráfico 18).

Como controle positivo da expressão da anexina V e do iodeto de propídeo foram utilizadas células de melanoma tratadas com 3,75 μ M dos quimioterápicos etoposídeo e paclitaxel. Os resultados desse controle foram analisados pelo programa de aquisição *Cell-Quest* e estão apresentados nos gráficos 19 e 20 .



a: diferenças estatísticas entre o grupo S/FH vs 1X;
b: diferenças estatísticas entre o grupo S/FH vs 5X;
c: diferenças estatísticas entre o grupo S/FH vs 10X;
d: diferenças estatísticas entre o grupo 1X vs 5X;
e: diferenças estatísticas entre o grupo 1X vs 10X.
f: diferenças estatísticas entre o grupo 5X vs 10X
Teste de Variância ANOVA

Gráfico 17 - Gráfico representativo das médias \pm DP da expressão do fosfolípido anexina-V em (A), para a avaliação da apoptose na cultura primária de hepatócitos, após 24 horas da adição dos fatores hepatotróficos nas concentrações de 1X, 5X e 10X, n=5



Concentração de fatores hepatotróficos *in vitro*

- a: diferenças estatísticas entre o grupo S/FH vs 1X;
 - b: diferenças estatísticas entre o grupo S/FH vs 5X;
 - c: diferenças estatísticas entre o grupo S/FH vs 10X;
 - d: diferenças estatísticas entre o grupo 1X vs 5X;
 - e: diferenças estatísticas entre o grupo 1X vs 10X;
 - f: diferenças estatísticas entre o grupo 5X vs 10X.
- Teste de Variância ANOVA.

Gráfico 18 - Gráfico representativo das médias \pm DP de células necróticas na cultura primária de hepatócitos, após 24 horas da adição dos fatores hepatotróficos nas concentrações de 1X, 5X e 10X, n=5

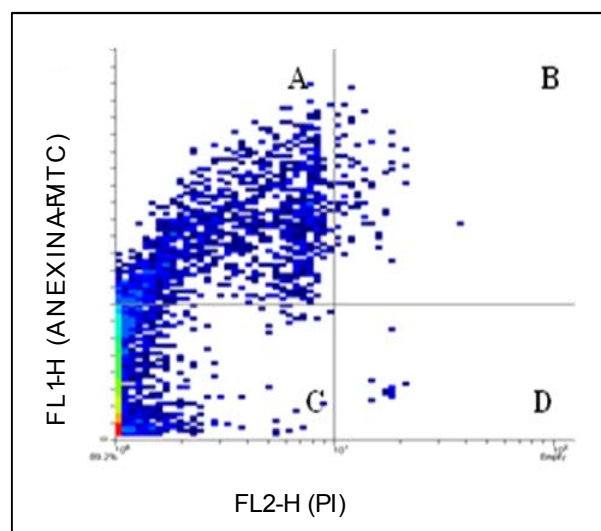


Gráfico 19 - Gráfico da relação FL1-H (Anexina V-FITC) e FL2-H (IP) em culturas primárias de hepatócitos, após 24 horas da adição dos fatores hepatotróficos, (A) células em apoptose, (B) células mortas, (C) células viáveis e (D) células mortas por necrose

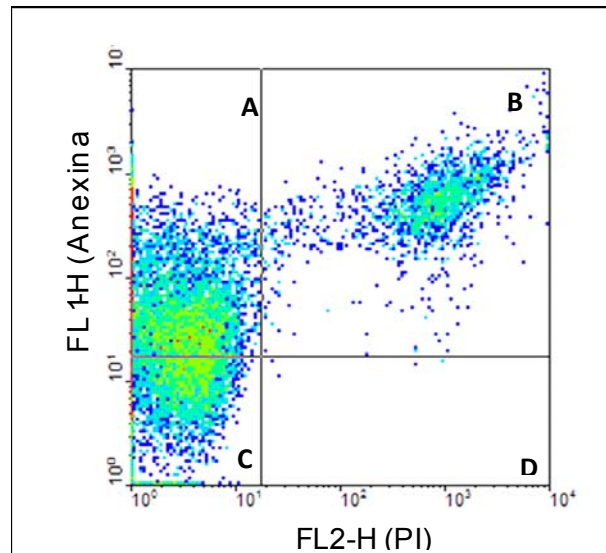
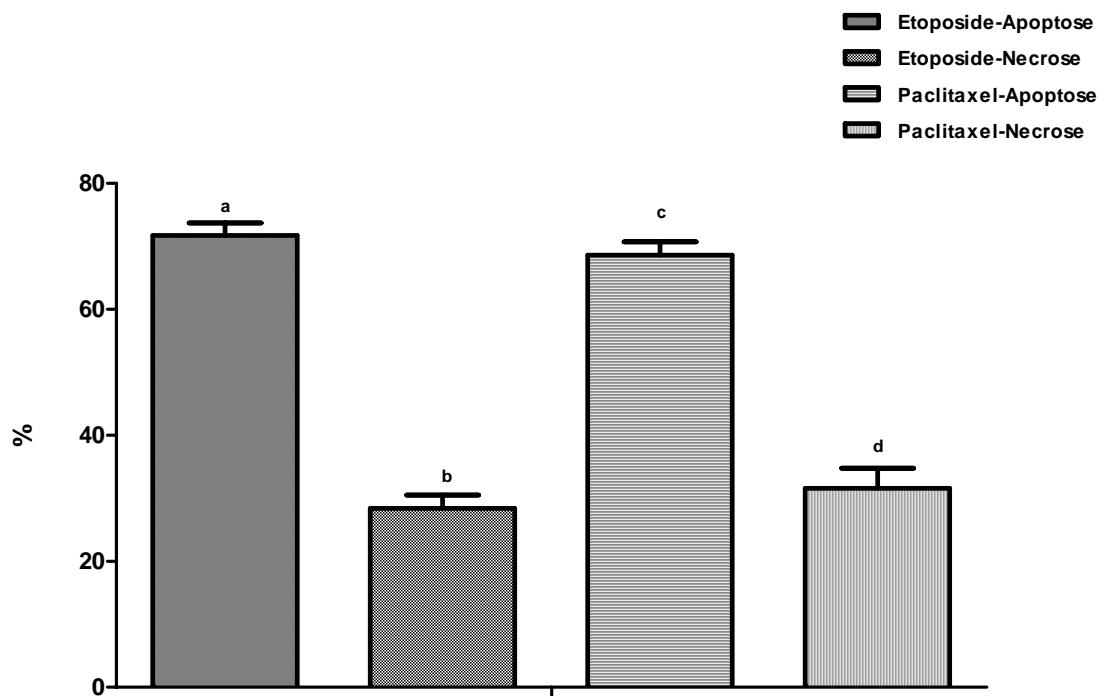


Gráfico 20 - Gráfico adquirido pelo programa *Cell-Quest* em citômetro FACSCALIBUR-BD. Controle positivo - Células de melanoma B16F10 tratadas com os quimioterápicos Etoposídeo e Paclitaxel. No quadrante (A) células apoptóticas (B) células mortas, em anexinaV/PI (+), em (C) células viáveis e em (D) células necróticas



* $p < 0,05$ teste de variância de ANOVA

Gráfico 21 - Gráfico das médias \pm DP das populações celulares apoptóticas e/ou necróticas das células de melanoma B16F10 tratadas com os quimioterápicos Etoposídeo e Paclitaxel (controle positivo)

5.8 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR DE HEPATÓCITOS APÓS A ADIÇÃO DOS FATORES HEPATOTRÓFICOS

Após o crescimento dos hepatócitos nas diferentes condições experimentais, onde foram adicionados os fatores hepatotróficos nas concentrações 1X, 5X e 10X; as células foram recolhidas das placas de cultura e, imediatamente após a centrifugação, o botão celular foi ressuspendido em álcool 70° GL contendo 1µg de RNase. As amostras foram armazenadas até o momento de sua utilização em freezer a - 20° C.

O delineamento experimental utilizado para a avaliação das fases do ciclo celular foi preconizada pelo método do iodeto de propídeo que se incorpora/intercala às fitas de DNA. Foram avaliadas separadamente as populações de hepatócitos contidos no ciclo celular e as células mortas/restos celulares ou as que apresentaram DNA fragmentado. Os dados estão descritos sumariamente nas tabelas 6 a 8 e gráfico 22.

Os resultados das amostras dos hepatócitos cultivados por 24 horas na presença da mistura de fatores hepatotróficos na concentração de 1X não mostraram diferenças significativas ($p > 0,05$) na distribuição da população de hepatócitos nas fases do ciclo celular. Não há de maneira expressiva modificações na proporção de células mortas por necrose ou apoptose quando comparada ao controle, S/FH (Tabela 5 e Gráfico 22)

Por outro lado, as demais concentrações dos fatores hepatotróficos de 5X e 10X aumentaram significativamente ($p < 0,001$) a proporção de células mortas por necrose/apoptose em $38,3 \pm 3,1$ e $37,4 \pm 3,0$ respectivamente (Tabela 5).

Os dados apresentados na tabela 5 mostraram que as culturas dos hepatócitos por 72 horas na presença da mistura dos fatores hepatotróficos nas concentrações de 1X, 5X e 10X não modificaram a distribuição das células nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular. Entretanto, aumentaram significativamente a população de células mortas por necrose/apoptose ($p < 0,001$), independentemente da concentração de fatores hepatotróficos adicionados à cultura (Gráfico 20 A e B).

Foi evidenciado, que após a adição dos fatores hepatotróficos 48 e 72 horas em todas as concentrações utilizadas houve aumento da capacidade de síntese (S) (Tabelas 6 e 7 e gráficos 24 e 25); quando comparadas às culturas mantidas 24 horas (Tabela 5 e Gráfico 23).

As análises comparativas dos hepatócitos do grupo S/FH na proporção de células apoptóticas/necróticas ao longo do cultivo celular, 24, 48 e 72 horas mostraram aumento significativo em torno de 1,5 vezes em comparação ao tempo inicial (Tabelas 5, 6 e 7).

A adição dos fatores hepatotróficos na concentração 1X às culturas, após a estimulação da proliferação de hepatócitos aumentou a proporção de células em apoptose/necrose em torno de 2,3 vezes, nos intervalos de 24, 48 e 72 horas (Tabelas 5, 6 e 7).

Os hepatócitos cultivados na presença dos fatores hepatotróficos na concentração 5X mostraram não haver diferenças significativas ($p > 0,05$) na proporção de células apoptóticas/necróticas nos intervalos de 24 e 48 horas. (Tabelas 5 e 6).

Os experimentos realizados com os fatores hepatotróficos na concentração 10X (Gráficos 23, 24 e 25) mostraram uma diminuição na proporção de células apoptóticas/necróticas somente no período de 48 horas (Tabela 6 e Gráfico 24), fato já detectado na concentração 5X e também avaliado nos ensaios de viabilidade (Tabela 4).

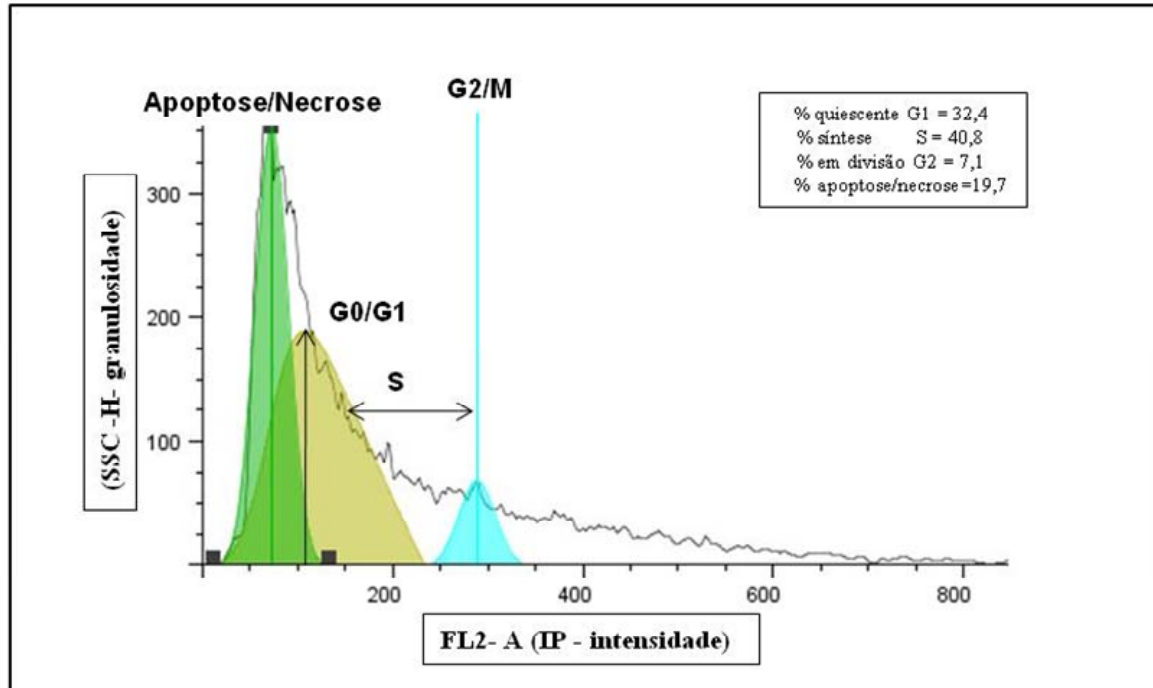
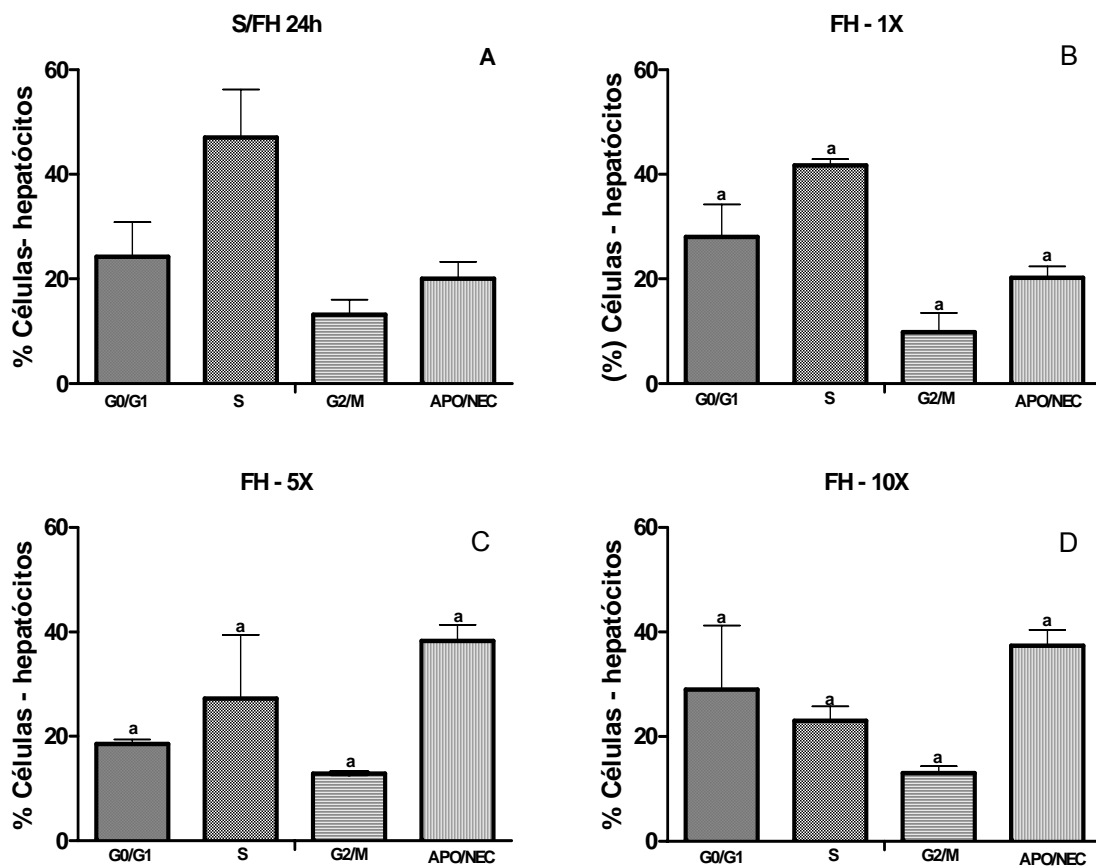


Gráfico 22 – Histograma representativo após análise no programa *FlowJo*®, mostrando a distribuição do conteúdo de ADN nas fases do ciclo celular na cultura primária de hepatócitos com adição dos FH na concentração de 1X, após 24 horas de tratamento

Tabela 5 - Médias \pm DP das fases do ciclo celular das culturas primárias de hepatócitos dos grupos S/FH e FH nas concentrações 1X, 5X e 10X após 24 horas de tratamento

Tratamentos (n=3)	G0/G1	S	G2/M	Apoptose/Necrose
S/FH	21,2 \pm 6,6	17,05 \pm 9,2	13,2 \pm 2,8	20,0 \pm 3,4
FH 1X	28,0 \pm 6,2	41,7 \pm 1,2	9,8 \pm 3,7	20,2 \pm 2,2
FH 5X	18,5 \pm 0,9	27,2 \pm 12,2	12,8 \pm 0,2	38,3 \pm 3,1
FH 10X	29,0 \pm 12,2	23,0 \pm 2,8	13,0 \pm 1,4	37,4 \pm 3,0

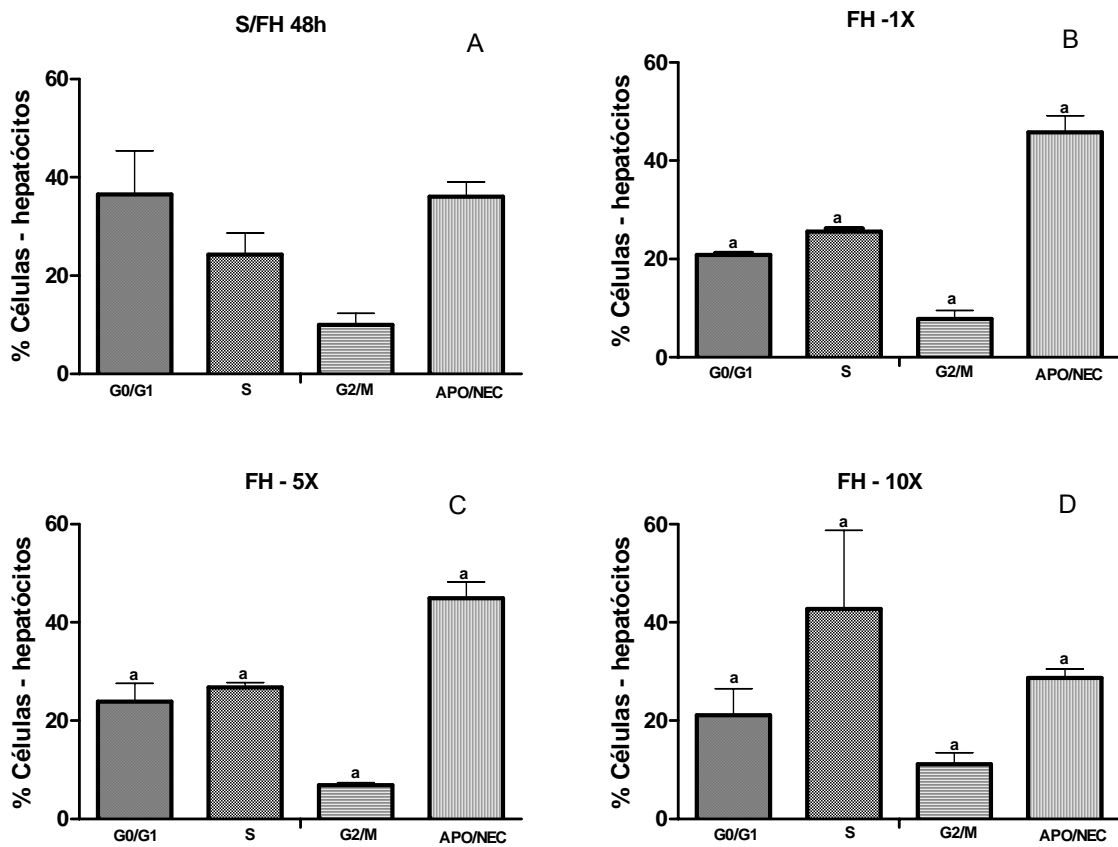


-*** $p < 0,001$, Teste de Variância ANOVA

Gráfico 23 - Gráfico representativo das médias \pm DP das fases do ciclo celular da cultura primária de hepatócitos do grupo controle (A) e, após a adição dos fatores nutricionais nas concentrações de 1X (B), 5X (C) e 10X (D), durante 24 horas de tratamento

Tabela 6 - Médias \pm DP das fases do ciclo celular das culturas primárias de hepatócitos dos grupos S/FH e FH nas concentrações 1X, 5X e 10X, após 48 horas de tratamento

Tratamentos (n=3)	G0/G1	S	G2/M	Apoptose/Necrose
S/FH	36,5 \pm 9	24,3 \pm 4,4	10,0 \pm 2,4	36,1 \pm 3,0
FH 1X	0,9 \pm 0,4	25,6 \pm 0,6	7,8 \pm 1,7	45,8 \pm 3,4
FH 5X	23,9 \pm 3,7	26,8 \pm 1,0	6,9 \pm 0,5	44,9 \pm 3,3
FH 10X	21,1 \pm 5,4	42,7 \pm 4,0	11,2 \pm 2,3	28,7 \pm 1,8



*** $p < 0,001$, Teste de Variância ANOVA

Gráfico 24 - Gráfico representativo das médias \pm DP das fases do ciclo celular da cultura primária de hepatócitos do grupo controle (A) e, após a adição dos fatores hepatotróficos nas concentrações de 1X (B), 5X (C) e 10X (D), durante 48 horas de tratamento

Tabela 7 - Médias \pm DP das fases do ciclo celular das culturas primárias de hepatócitos dos grupos S/FN e FN nas concentrações 1X, 5X e 10X, após 72 horas de tratamento

Tratamentos (n=3)	G0/G1	S	G2/M	Apoptose/Necrose
S/FN	22,2 \pm 7,9	39,2 \pm 14,5	13,6 \pm 5,0	25,3 \pm 2,5
FN 1X	22,6 \pm 1,0	18,9 \pm 7,9	13,3 \pm 0,8	47,4 \pm 3,4
FN 5X	28,3 \pm 4,7	27,7 \pm 13,9	8,6 \pm 1,3	33,5 \pm 2,9
FN 10X	23,2 \pm 6,2	24,8 \pm 14,3	11,2 \pm 1,8	36,1 \pm 3,0

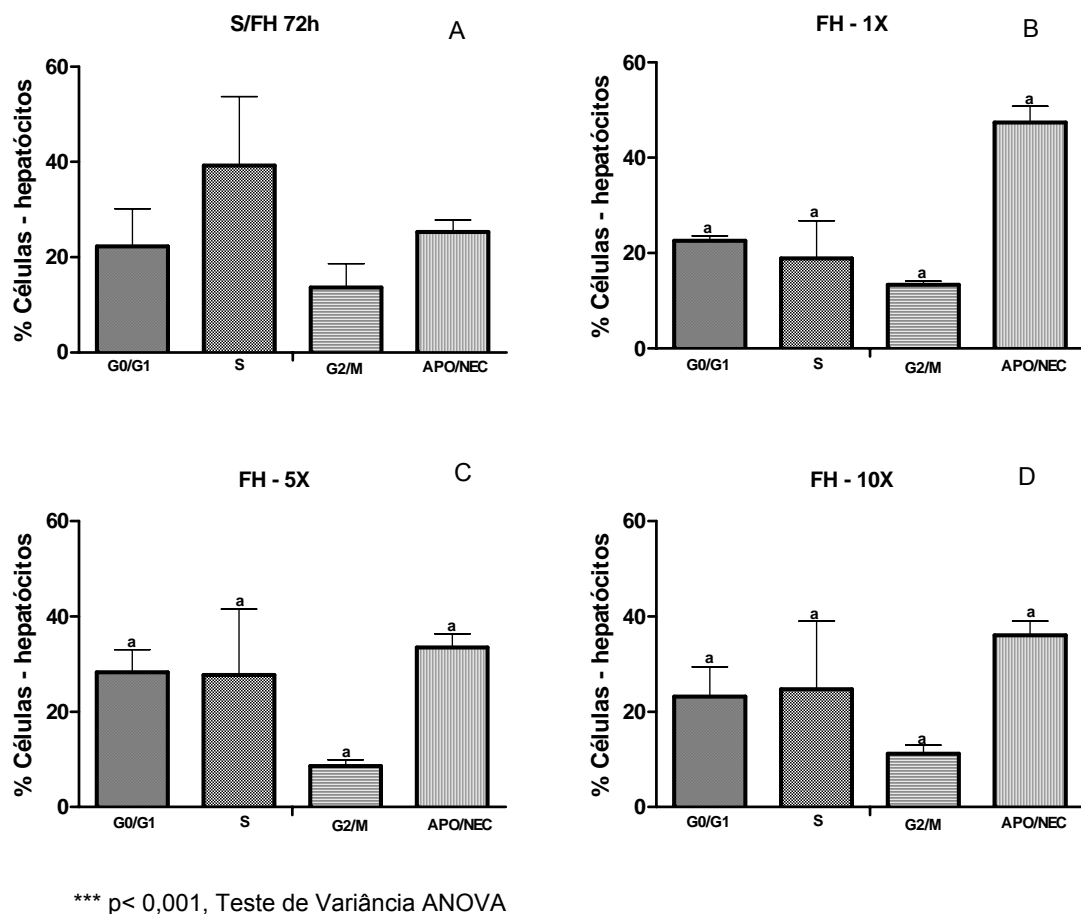


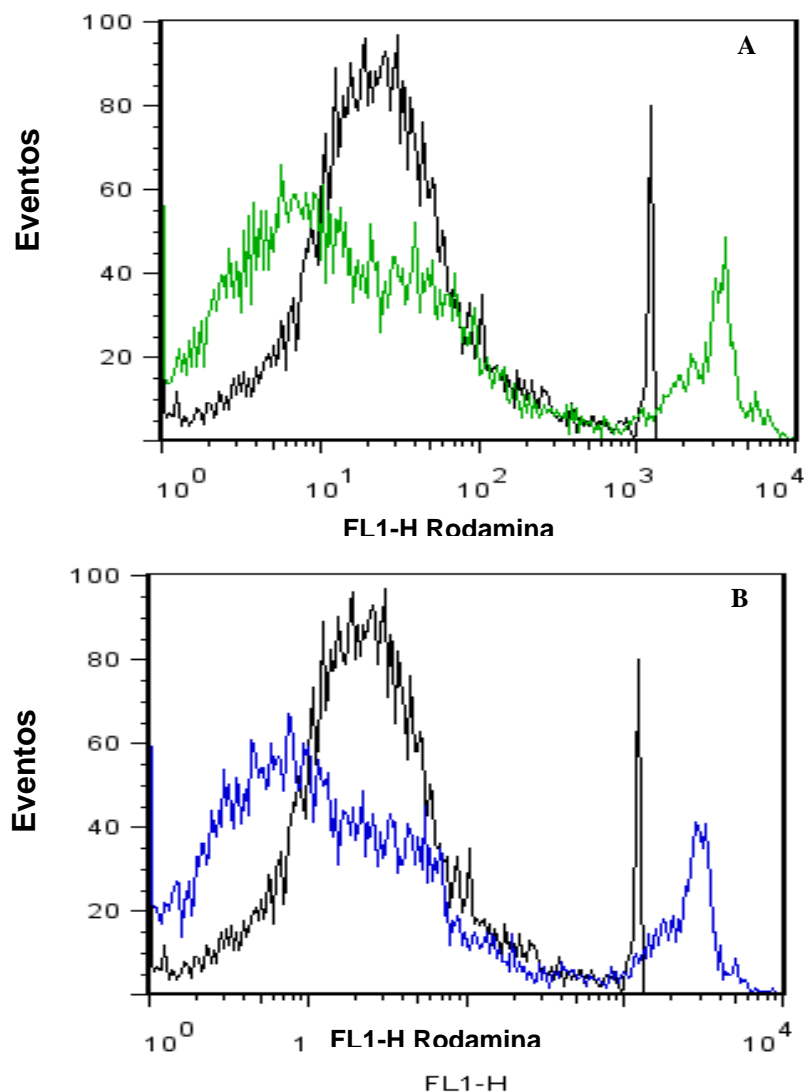
Gráfico 25 - Gráfico representativo das médias \pm DP das fases do ciclo celular na cultura primária de hepatócitos do grupo controle (A) e, após a adição dos FH nas concentrações de 1X (B), 5X (C) e 10X (D), durante 72 horas de tratamento

5.9 A ATIVIDADE DO POTENCIAL ELÉTRICO DA MITOCÔNDRIA

A integridade e o potencial elétrico da membrana mitocondrial foram avaliados pela incorporação da rodamina 123 (Rho-123) em hepatócitos cultivados na presença e ausência de FH por citometria de fluxo. Nos hepatócitos obtidos inicialmente (T0) observou-se um potencial elétrico basal mínimo, demonstrando a integridade e a viabilidade das mitocôndrias (Gráficos 26, 27 e 28), que após a manutenção em cultura e estímulo proliferativo dos FH nas concentrações de 1X e 10X aumentaram significativamente 24 e 72 horas após o tratamento (Gráfico 26 A e B). Os valores das

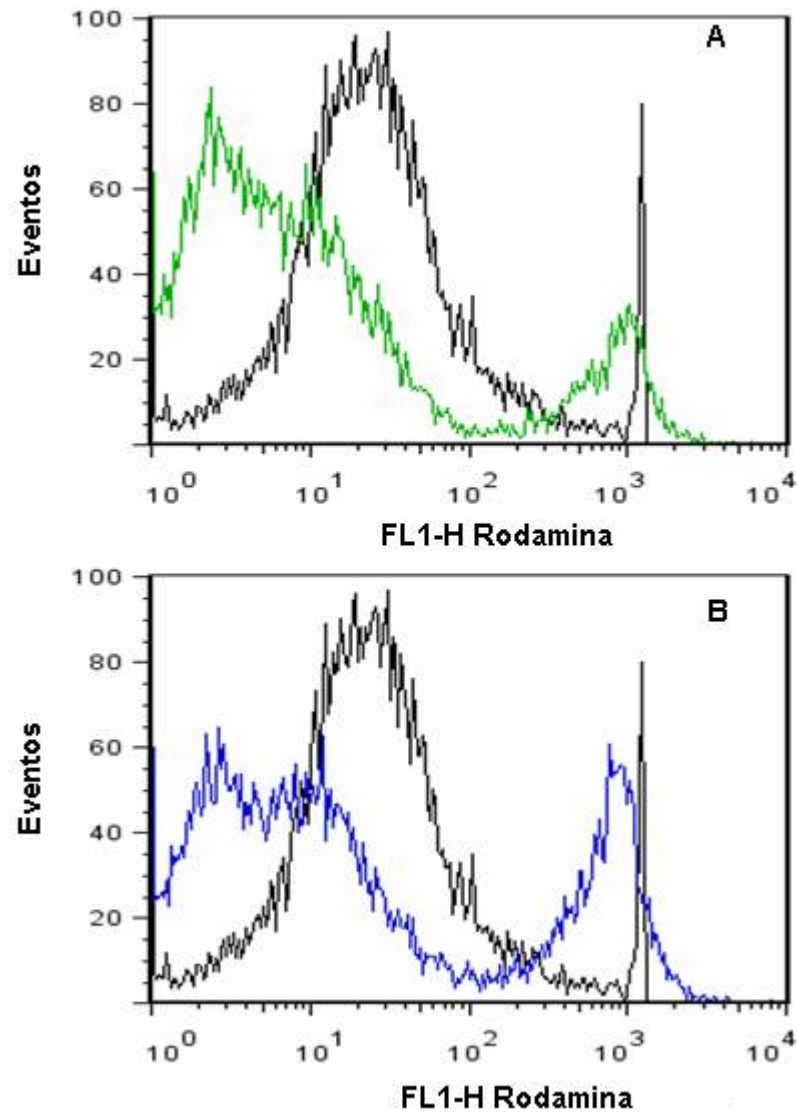
médias e desvio padrão obtido dos diferentes grupos experimentais, bem como as comparações estatísticas estão apresentados no gráfico 29 e tabela 9.

A diferença estatística entre a intensidade de ligação e permeabilização pela membrana mitocondrial do fluorocromo Rh 123 foi analisado entre os diferentes grupos experimentais pelo programa de comparações entre as unidades arbitrárias de fluorescência a partir da tangência das retas dos diferentes grupos pelo teste Kolmogorov-Smirnov, apresentados no anexo C.



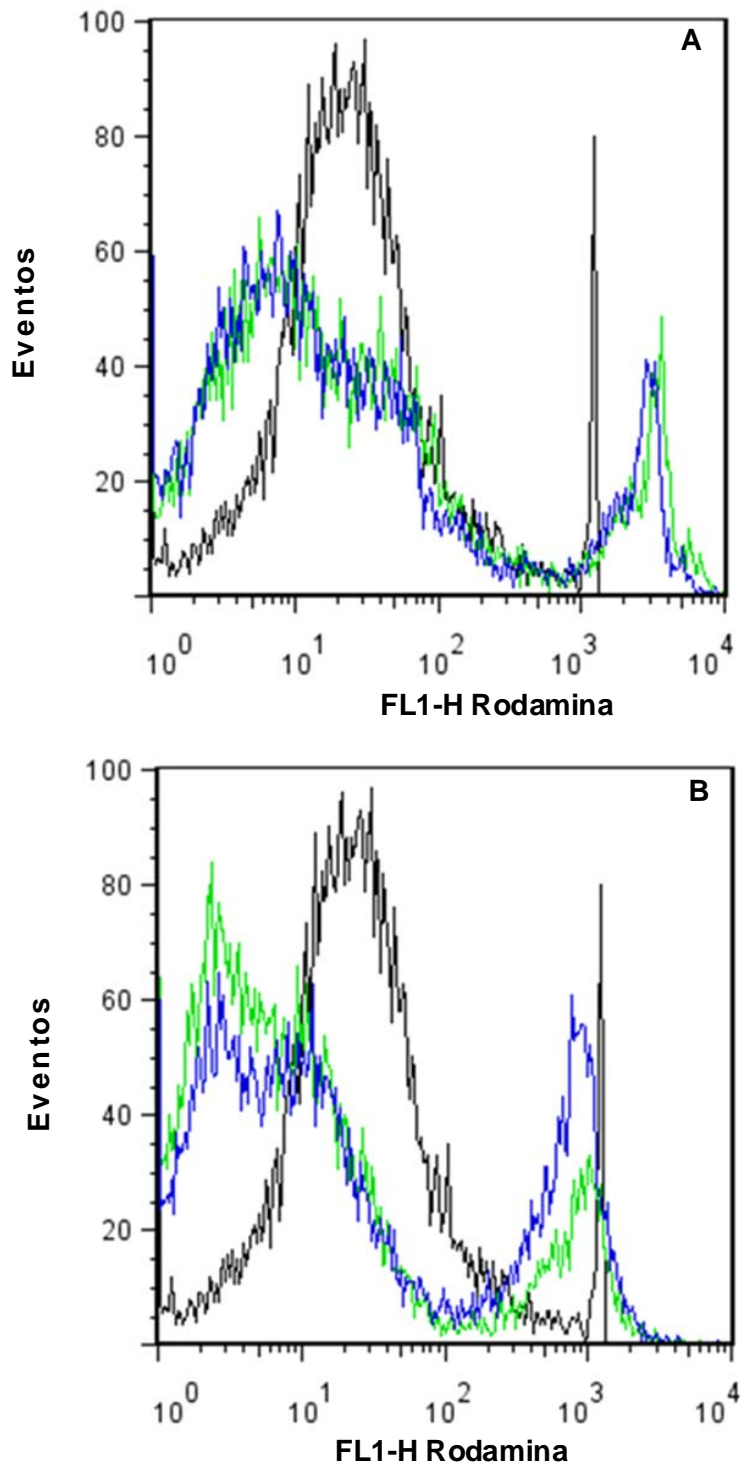
- curva representada na cor preta refere-se aos hepatócitos obtidos em T0
- curva representada na cor verde refere-se aos hepatócitos obtidos FH-1X
- curva representada na cor azul refere-se aos hepatócitos obtidos FH-10X

Gráfico 26 - Histograma representativo da curva de potencial da membrana mitocondrial marcado com Rodamina 123, adquirido pelo programa *Cell Quest*® e analisado pelo Teste Kolmogorov-Smirnov. As curvas representam os diferentes potenciais da membrana dos hepatócitos tratados e não tratados com FH nas concentrações 1X(A) e 10X (B), após 24 horas de cultura



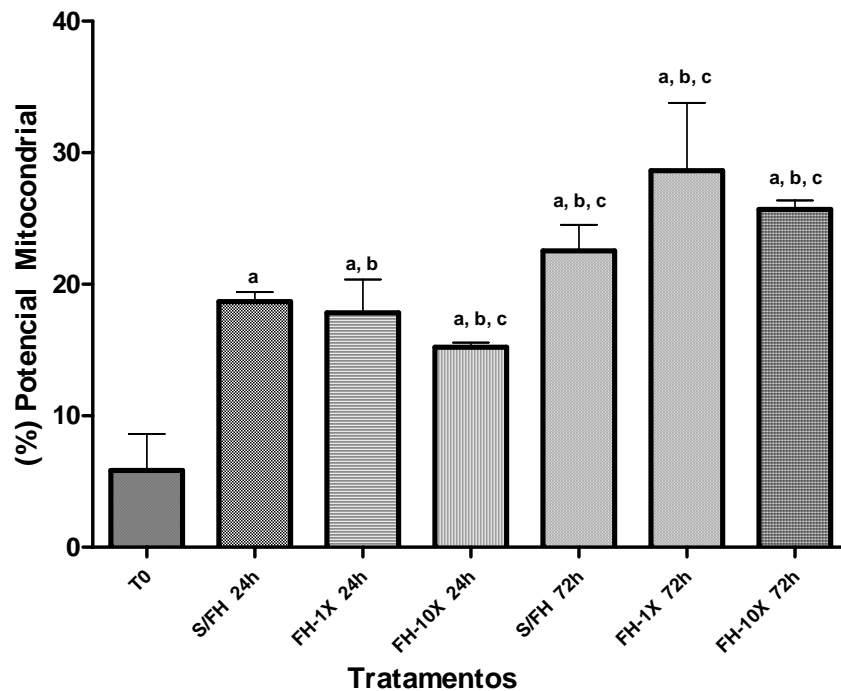
- curva representada na cor preta refere-se aos hepatócitos obtidos em T0
- curva representada na cor verde refere-se aos hepatócitos obtidos FH-1X
- curva representada na cor azul refere-se aos hepatócitos obtidos FH-10X

Gráfico 27 - Histograma representativo da curva de potencial da membrana mitocondrial marcado com Rodamina 123, adquirido pelo programa *Cell Quest*® e analisado pelo Teste Kolmogorov-Smirnov. As curvas representam os diferentes potenciais da membrana dos hepatócitos tratados e não tratados com FH nas concentrações 1X (A) e 10X (B), após 72 horas de cultura



- curva representada na cor preta refere-se aos hepatócitos obtidos em T0
- curva representada na cor verde refere-se aos hepatócitos obtidos FH-1X
- curva representada na cor azul refere-se aos hepatócitos obtidos FH-10X

Gráfico 28 - Histograma representativo comparativo do potencial da membrana mitocondrial Rodamina 123, adquirido pelo programa *Flow Jo*® dos hepatócitos tratados e não tratados com FH nas concentrações 1X e 10X, após 24 horas (A) e 1X e 10X, após 72 horas (B)



Teste de múltiplas comparações Tukey-Kramer

- a: diferenças estatísticas entre os tempos de cultivo T0 e a presença ou ausência dos fatores hepatotróficos 1X e 10X, após 24 e 72 horas de cultivo;
- b: diferenças estatísticas entre os tempos de cultivo S/FH 24h e a presença ou ausência dos fatores hepatotróficos 1X e 10X, após 24 e 72 horas de cultivo;
- c: diferenças estatísticas entre os tempos de cultivo FH-1X 24h e a presença ou ausência dos fatores hepatotróficos 1X e 10X, após 24 e 72 horas de cultivo.

Gráfico 29 - Gráfico de barra das médias \pm DP da atividade do potencial da membrana mitocondrial de hepatócitos de cultura primária, após 24 e 72 horas de tratamento, na presença ou ausência de fatores hepatotróficos nas concentrações 1X e 10X. Experimentos independentes realizados em triplicata

Tabela 8 - Análise da média \pm DP da atividade do potencial de membrana mitocondrial de hepatócitos mantidos em cultura primária por 24 e 72 horas após a adição de FH nas concentrações 1X e 10X por citometria de fluxo

Tratamento/tempo (n=03)	Rodamina X \pm DP
T0	05,8 \pm 2,7
S/FH 24 h	18,7 \pm 0,7
FH1X 24h	17,8 \pm 2,5
FH10X 24h	15,2 \pm 0,3
S/FH 72h	22,5 \pm 2,0
FH1X 72h	28,6 \pm 5,1
FH10X 72h	25,7 \pm 0,7

X: média DP: desvio padrão

5.10 AVALIAÇÃO DO PERFIL BIOQUÍMICO-ENZIMÁTICO DE HEPATÓCITOS CULTIVADOS COM FATORES HEPATOTRÓFICOS

As determinações das enzimas hepáticas foram realizadas em extratos citosólicos dos hepatócitos mantidos em cultura na presença e na ausência dos FH nas concentrações 1X e 10X analisados nos períodos de 24 e 72 horas de tratamento. Todos os resultados foram corrigidos pela concentração de proteína total obtida pelo método de Bradford das porções citosólicas dos hepatócitos rompidos mecanicamente em nitrogênio líquido.

Os valores foram expressos em médias e desvio padrão de 03 culturas independentes, sendo que as unidades obtidas para a gama glutamil transferase GGT, alanino amino transferase ALT, aspartato amino transferase AST foi de U/L e para a atividade da amilase em unidades amilolíticas por mL (UA/mL). Foram utilizados como valores de referência e de comparação os valores obtidos na cultura no período T0, e os valores de significância do tratamento com os FH obtidos nas comparações dos períodos de 24 e 72 horas.

Os resultados mostraram que a concentração da GGT/UL aumentou significativamente no período de 24 horas na concentração 10X dos FH, enquanto que após 72 horas sua concentração foi diminuída significativamente. A determinação das transaminases ALT e AST mostrou comportamento semelhante sendo que a concentração de 10X foi aumentada após 24 horas de cultivo em relação a concentração de 1X dos FH, e diminuindo significativamente a sua atividade após 72 horas de cultivo na concentração de 10X de FH. Os dados da atividade da amilase mostraram aumento progressivo ao longo do cultivo acentuando-se significativamente em todas as condições experimentais após 72 horas do tratamento. Os valores médios e o desvio padrão da atividade bioquímica dos hepatócitos mantidos em cultura por 24 e 72 horas na presença e ausência de FH nas concentrações de 1X e 10X estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9 - Análise bioquímico-enzimática das culturas primárias de hepatócitos após a adição de FH 1X e 10X, 24 e 72 horas de tratamento

Tratamentos/Tempo (n=3)	GGT (U/L) Gama glutamil transferase	ALT (U/L)TGP Alanino amino transferase	AST (U/L)TGO Aspartato amino transferase	AMILASE (UA/mL) Unidade amilolítica/mL
S/FH t0	5,7 ± 0,8	1,4 ± 0,3	2,7 ± 0,5	14,1 ± 1,6
S/FH 24h	14,7 ± 1,4	4,5 ± 1,2	7,0 ± 1,2	11,6 ± 1,1
FH 1X 24h	13,1 ± 2,3	5,2 ± 1,3	6,6 ± 1,0	71,0 ± 0,9 ^{a, b}
FH 10X 24h	34,8 ± 3,4 ^{a, b}	17,7 ± 2,4 ^{a, b, c}	17,5 ± 2,9 ^a	105,3 ± 7,5 ^{a, b}
S/FH 72h	51,5 ± 6,7 ^{a, b}	7,8 ± 1,7 ^{a, c}	27,4 ± 4,2 ^{a, b, c}	276,6 ± 15,6 ^{a, b, c}
FH 1X 72h	159,4 ± 10,2 ^{a, b, c}	3,8 ± 1,2 ^c	85,2 ± 12,9 ^{a, b, c}	351,1 ± 22,1 ^{a, b, c}
FH 10X 72h	7,0 ± 1,3 ^c	1,0 ± 0,7 ^c	3,4 ± 0,5	314,5 ± 18,0 ^{a, b, c}

X: média

DP: desvio padrão

- a: diferenças estatísticas entre os tempos de cultivo T0 e a presença ou ausência dos fatores hepatotróficos 1X e 10X, após 24 e 72 horas de cultivo;
- b: diferenças estatísticas entre os tempos de cultivo S/FH 24h e a presença ou ausência dos fatores hepatotróficos 1X e 10X, após 24 e 72 horas de cultivo; e
- c: diferenças estatísticas entre os tempos de cultivo FH-1X 24h e a presença ou ausência dos fatores hepatotróficos 1X e 10X, após 24 e 72 horas de cultivo.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesta tese mostraram que os fatores hepatotróficos foram capazes de aumentar a síntese e promover a progressão nas fases do ciclo celular, induzindo o aumento da capacidade mitótica e proliferativa nos períodos estudados. Após esse período, há uma diminuição deste potencial proliferativo, especificamente nos grupos tratados com FH na concentração de 10X. Os resultados desta tese corroboram os da literatura em que fatores de crescimento, como o fator de crescimento hepático (HGF), e interleucina-6 (IL-6), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator transformador do crescimento (TGF α) têm sido aplicados para estimular a síntese de ADN *in vitro* (PING et al., 2006).

Outro aspecto avaliado foi a determinação do potencial citotóxico destes fatores em ensaios de citometria de fluxo. Os resultados também demonstraram que estes fatores não são citotóxicos ao longo do período de cultura, porém na concentração de 10X, em virtude da alta capacidade da resposta proliferativa, há uma proporcionabilidade no aumento das células mortas ou inviáveis metabolicamente.

A adição dos FH nas concentrações estudadas nas culturas de hepatócitos mostrou-se eficaz na manutenção dessas células, mantendo-se funcionalmente ativos, com a expressão dos marcadores de seu metabolismo e diferenciação, ou seja, não alterou as características normais dos hepatócitos. Mullhaupt et al. (1994) evidenciaram, por meio de modelo envolvendo cultura celular, que a proliferação dos hepatócitos é regulada predominante mas não exclusivamente por mecanismos autócrinos. Haveria também a participação de células de outros órgãos, promovendo a regulação endócrina, desde que houvesse a expressão de receptores adequados na membrana dos hepatócitos. Portanto, durante o período de progressão, o processo de proliferação seria dependente de mecanismos conjuntos autócrinos, parácrinos e endócrinos (MICHAPOULOS, 2007; DUNCAN; DORREL; GROMPE, 2009).

O potencial proliferativo foi confirmado e mostrou-se diferente em sua expressão nas concentrações de FH 1X e 10X, nos ensaios colorimétricos pelo MTT e de citometria avaliados pelo potencial elétrico da membrana mitocondrial e de

difusão do iodeto de propídeo; os FH nas diferentes concentrações não são citotóxicos (Gráficos 6, 7 e 8). Estes resultados estão de acordo com PARRA et al. (1992) que demonstraram *in vivo* que a administração de FH aumenta o tamanho do fígado sadio dos ratos, contrariando a determinação biológica do tamanho do fígado seja pré-determinado. A administração intraperitoneal no sistema porta de fatores hepatotróficos similares qualitativamente às substâncias e hormônios presentes no sangue esplâncnico induz o aumento da capacidade proliferativa *in vivo* (PARRA et al., 1992).

Os FH utilizados nesta pesquisa são, provavelmente em conjunto, os responsáveis pelo incremento no número de células em replicação nos períodos analisados nos grupos neste trabalho. A adição dos FH nas concentrações de 1X, 5X e 10X aumentou significativamente o potencial proliferativo deste tipo celular. Todavia, os grupos controles analisados nos diferentes períodos de cultivo, nos quais não foram adicionados os fatores hepatotróficos, é nítida a redução da capacidade proliferativa, entretanto é uma condição normal no grupo controle, que por sua vez é menor quando comparada aos FH. Outro possível mecanismo seria a diminuição da expressão celular de moléculas de adesão (CAM), causado pela glutamina, assim como uma inibição da migração endotelial dos neutrófilos o que por si retarda o processo regenerativo tecidual. A glutamina tem sido apontada como possuidora de propriedades favoráveis à regeneração de inúmeros tecidos orgânicos, dentre os quais se encontra o tecido hepático. Alguns autores demonstraram ser a glutamina um fator importante no metabolismo de proteínas e outros aminoácidos em situações de estresse, situações nas quais foi constatado que seus níveis séricos encontravam-se diminuídos. Ademais, tem-se verificado um efeito negativo da glutamina na translocação bacteriana, comum em processos regenerativos orgânicos, e a qual retarda o processo regenerativo (DEVEY; CROWE 2000; MOHR et al., 2003).

Avanços no desenvolvimento de condições de cultivo promoveram a proliferação de hepatócitos de roedores. Há dois métodos de multiplicação de hepatócitos *in vitro*, um é o uso de nicotinamida e outro é o uso de meios enriquecidos. Em meios de cultura contendo altas concentrações de nicotinamida e fatores de crescimento os hepatócitos podem proliferar. Nesta condição de cultivo, pequenas células mononucleadas, chamadas de pequenos hepatócitos aparecem e formam colônias. Pequenos hepatócitos possuem alto potencial de proliferar

enquanto mantêm as características hepáticas e podem se diferenciar em hepatócitos maduros. Por outro lado, a combinação de meio ricos em nutrientes com a adição de 2% de dimetilsulfóxido tornou possível que os hepatócitos proliferados apresentassem e mantivessem funções diferenciadas por longo tempo *in vitro* (MITAKA, 1998; SANTOS et al., 2003).

Diversas substâncias têm sido utilizadas em animais parcialmente hepatectomizados para avaliar o seu papel no processo regenerativo e no estresse oxidativo induzido pela hepatectomia parcial, uma vez que a peroxidação lipídica é um dos fatores moduladores do fenômeno da regeneração hepática (RONCO et al., 2002; TREJO-SOLÍS et al., 2003). Nestes modelos, o processo de regeneração hepática é dividido em etapas: iniciação, progressão, fase de ciclo celular e fase final com parada da proliferação. A fase iniciação está associada à resposta geral à agressão ao fígado com alterações de citocinas que deflagram a proliferação celular. Há evidências de que o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e a IL-6 são importantes citocinas relacionadas às vias de sinalização precoces que levam à regeneração. A IL-6 é secretada pelas células de Kupfer, e esta secreção é regulada pelo TNF- α (MICHAPOULOS; DEFRANCES, 1997). A IL-6 é um importante estimulador da síntese de proteínas de fase aguda nos hepatócitos, como parte da resposta inflamatória geral (GAULDIE; RICHARDS; BAUMANN, 1992). A concentração sérica de IL-6 eleva-se após hepatectomia parcial, atingindo pico em 24 horas (MATSUNAMI et al., 1992). Também a IL-6 é responsável pela ativação de fatores de transcrição, como o *STAT 3 (Signal Transduction and Activator of Transcription-3)*, *NFkappaB (Nuclear factor kappa B)* e *AP-1 (Activating protein-1)*, os quais estimulam a síntese de ADN (MANGNALL; BIRD; MAJEED, 2003).

A fase de progressão é caracterizada pelo aparecimento dos fatores de crescimento envolvidos na proliferação celular (MANGNALL; BIRD; MAJEED, 2003), destacando-se fator de crescimento hepatotrófico (*HGF*), fator transformador de crescimento-alfa (*TGF- α*), fator de crescimento epidérmico (*EGF*), fator do crescimento endotelial vascular (*VEGF*) e fator de crescimento do fibroblasto (*FGF*) (MICHAPOULOS; DEFRANCES, 1997; MICHAPOULOS, 2007; DUNCAN; DORREL, GROMPE, 2009). Os resultados obtidos nas culturas primárias de hepatócitos, como modelo experimental, semelhantes à HP, a adição dos FH nas diversas concentrações foi capaz de aumentar o número de células nas diferentes fases do ciclo celular, mostrando ser um agente indutor da fase de progressão, portanto é

uma mistura complexa de substâncias envolvidas no suporte de fatores de crescimento. Nos diferentes períodos de cultivo há uma distribuição cinética em resposta às diferentes concentrações dos FH. O tratamento com as diferentes concentrações dos FH em hepatócitos mostrou que a morte celular por apoptose foi maior na concentração de 10X em relação às concentrações de 1X e 5X dos FH.

Quanto à fase do ciclo celular, sabe-se que normalmente os hepatócitos se encontram quiescentes, na fase G₀, após o estímulo de citocinas da fase *iniciação*, ocorre ativação de genes que levam os hepatócitos da fase G₀ para G₁. Nesta, as células tornam-se responsivas aos fatores de crescimento e progridem pelo ciclo celular, passando para a fase S, em que há síntese de ADN. Segue-se a fase G₂, em que são sintetizadas as proteínas necessárias para a divisão celular, e por fim a fase da mitose (M) propriamente dita (FAUSTO; CAMPBELL, 2003).

Após uma fase de intenso crescimento e reestruturação do parênquima hepático, o processo regenerativo cessa. A síntese de ADN se completa em 72 horas, seguindo-se as alterações histológicas. O principal sinalizador da parada da multiplicação celular é o TGF- β 1. Sabe-se que a regulação do crescimento hepático está relacionada com o peso corpóreo e não depende do volume do fígado residual (FAUSTO; CAMPBELL, 2003). Os resultados mostraram que os FH nas diferentes concentrações induziram resposta de síntese (fase S), que poderiam estimular a progressão e cinética nas fases do ciclo celular (Tabelas 3 e 4), como também nestas mesmas condições experimentais promoveram o aumento da síntese de colágeno. O aumento da matriz extracelular é um sinalizador positivo para a resposta proliferativa dos FH. Contrário aos resultados obtidos por Fausto et al. (1986), nesta tese há uma resposta proliferativa ao longo do período de cultivo somada à resposta de síntese (fase S e colágeno), como também na expressão de receptores do citoesqueleto de hepatócitos, envolvidos na sua diferenciação e potencial proliferativo. Além disso, metabolicamente os hepatócitos mantidos em cultura foram capazes de sintetizar enzimas hepáticas, assim como transpostar e armazenar outras enzimas envolvidas no metabolismo digestório, após a adição dos FH e, que se mantiveram expressas até 72 horas.

Por outro lado, foi demonstrado que as CEH são responsáveis pelo armazenamento de vitamina e síntese de colágeno em resposta a lesões hepáticas, e também é capaz de ativar a resposta de linfócitos T (WINAU et al., 2007).

Há uma pequena população de células progenitoras hepáticas (ovais) ou *stem cells* que podem gerar todos os tipos de células presentes no fígado, nas condições usuais de hepatectomia parcial. Quando a multiplicação dos hepatócitos é impedida por lesões tóxicas, necrose maciça ou carcinogênese, ou em situações experimentais pela administração de galactosamina, dipina ou retorsina, as células tronco contribuem para a restauração da massa hepática funcional (MANGNALL; BIRD; MAJEED, 2003; MICHALOPOULOS, 2007, DUNCAN; DORREL; GROMPE, 2009). No entanto, a regeneração do fígado após hepatectomia parcial envolve a proliferação de todas as populações de células maduras que compõem o órgão intacto. Tais células incluem os hepatócitos, células do epitélio biliar, células endoteliais fenestradas, células de Kupfer e as células de Ito. Evidências sugerem que a maioria da manutenção do fígado é atingida diretamente pela divisão de hepatócitos e células epiteliais ductais (PONDER, 1996).

Os fatores hepatotróficos adicionados às culturas de hepatócitos induziram, neste trabalho, de acordo com a concentração, o aumento na proporção de células mortas por necrose, prevenindo a apoptose, possivelmente por aumentar o tempo de sobrevivência ou talvez o aumento da síntese de moléculas anti-apoptóticas via mitocondrial. Os experimentos da integridade da membrana mitocondrial demonstraram claramente a presença de um potencial ativo em hepatócitos cultivados na presença dos FH nos períodos estudados. Destacam-se os resultados da concentração de 10X, após 72 horas, que apesar do aumento gradativo da resposta proliferativa após o cultivo, ainda suportam um número maior de células viáveis, que em outras condições experimentais, como na ausência dos FH. Durante a regeneração e remodelação do tecido hepático, verificou-se que o fenômeno da apoptose ocorre como resposta fisiológica, com a finalidade de eliminar células defeituosas que porventura se formem durante o rápido processo de divisão celular. Apoptose é a morte induzida por programa intracelular, segundo o qual células destinadas a serem eliminadas ativam enzimas que degradam seu próprio ADN, proteínas nucleares e citoplasmáticas. É um fenômeno normal que permite a destruição de células que não são mais necessárias e a manutenção da estabilidade nos diferentes tecidos. No fígado, a apoptose é também responsável pela perda de células em doenças virais, agressões tóxicas e necrose isquêmica (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

A iniciação da apoptose, fenômeno amplo e complexo, ocorre por duas vias distintas: a extrínseca e a intrínseca. As duas vias convergem para a ativação das caspases. Na fase de execução da apoptose ocorre ativação das endonucleases, quebra da cromatina nuclear e do citoesqueleto. Há fragmentação da célula com a formação de corpos apoptóticos, constituídos de citoplasma, restos de organelas e fragmentos nucleares (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). A adição dos FH nos hepatócitos foi capaz de modificar expressivamente a proporção de células nas fases do ciclo celular, nos diferentes períodos, como também a indução de morte celular programada do tipo apoptose. Neste trabalho a morte celular do tipo apoptose foi caracterizada pela expressão do fosfolípido fosfatidil serina, anexina V, na membrana externa da célula em morte celular. A via extrínseca é iniciada pela união dos ligantes específicos, presentes no meio extracelular, com os chamados “receptores de morte” correspondentes, que se encontram na superfície da célula, que quando ativados transmitem um sinal de morte para o citoplasma. Os domínios de morte (DDs) se ligam às moléculas adaptadoras do tipo FADD (*Fas-associated death domain*) ou TRADD (*TNFR receptor adaptor with death domain*). Os domínios efetores de morte (DEDs) interagem formando um complexo DED-DED que seqüestra pró-caspases-8. Muitas moléculas de pró-caspase 8 se aglomeram e clivam umas as outras gerando caspase-8 ativada. A cascata de ativação das caspases é iniciada, o que leva à fase de execução da apoptose (ASHKENAZI, 2002).

O balanço entre a expressão de genes das proteínas pró-apoptóticas (Bak e Bax) e anti-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-XL) são de grande importância durante o processo de regeneração hepática (MASSON et al., 2000; KARAVIAS et al., 2003; AKCALI et al., 2004; TAKUSHI et al., 2006).

A capacidade regenerativa das células hepáticas *in vivo* é iniciada pelo recrutamento de células inflamatórias que neutralizam possíveis agentes infecciosos como também a remoção de células necróticas. Nesta fase as CEH são recrutadas para o sítio da lesão e são responsáveis pela síntese e secreção dos componentes da MEC. O recrutamento e a proliferação das CEH controlam a secreção de fatores solúveis que amplificam a organização das células (MARRA, 1999) *In vitro*, a adição dos FH induz possivelmente a produção e secreção de fatores solúveis para o meio capaz de aumentar a síntese de componentes da MEC como o colágeno, que respondem positivamente a estímulos de regeneração e remodelamento; como se

pode observar nos achados das expressões dos receptores e da atividade enzimática dessas células.

A manipulação nutricional é capaz de induzir a proliferação hepatocelular em fígados “sadios” de ratos e camundongos. Em modelos experimentais animais quando mantidos exclusivamente com solução glicosada a 20%, sem qualquer outra fonte nutricional durante três dias, seguida da refeição hiperprotéica, por exemplo, caseína hidrolisada, tem mostrado que a síntese de ADN não se altera durante os três dias de indução, mas eleva-se rapidamente após a administração de aminoácidos, sendo o pico obtido 15 horas após a refeição hiperprotéica, quando há um aumento de 16 vezes na síntese de ADN. A análise da expressão de proto-oncogenes reguladores da capacidade proliferativa durante o período de indução revelou aumento nos níveis de RNAm para os oncogenes c-jun, c-myn e p-53, semelhantemente ao observado nas primeiras horas após a hepatectomia parcial. Considerando também que o pico de síntese de ADN após a suplementação protéica ocorre 7-9 horas mais cedo em relação ao requerido após a hepatectomia parcial, pode-se presumir que a “iniciação” dos hepatócitos (transição G0-G1) ocorre ainda durante o período de privação protéica. Após a administração de aminoácidos, o hepatócito progride em direção a síntese de ADN, podendo-se detectar re-expressão do proto-oncogene p-53 e ativação de c-Ha-ras, cujo pico coincide com o pico de síntese de ADN. Quando hepatócitos, durante o período de indução, são transferidos para meios de cultura, estes são capazes de atingir o pico de síntese de ADN mais precocemente que hepatócitos normais (cerca de 20 horas mais cedo), na ausência de qualquer fator de crescimento (MEAD et al., 1990; RAMALHO, 1998; DUNCAN; DORREL, GROMPE, 2009).

Não se conhece o mecanismo pelo qual manipulação nutricional induz “iniciação” de hepatócitos. O efeito modulador pode ser secundário a uma reação de estresse induzida por alterações nutricionais e/ou adaptações metabólicas, resultados que também justificam os desta tese, em que a capacidade de multiplicação e diferenciação dos hepatócitos foi acompanhada pela expressão de marcadores para este tipo celular, como as citoqueratinas, ou ainda ressaltos os marcadores do metabolismo bioquímico específico dos hepatócitos, *in vitro*. Adaptações metabólicas ocorrem imediatamente após a hepatectomia parcial, causadas por maior demanda funcional imposta ao fragmento hepático remanescente, alterações metabólicas e/ou reações de estresse capazes de

desencadear o processo de proliferação celular (MEAD et al., 1990; RAMALHO, 1998; DUNCAN, DORREL, GROMPE, 2009).

A administração de doses diárias na cavidade peritoneal de ratos cirróticos durante sete dias da solução de FH mostraram um aumento da massa hepática de média de 114%, porém houve 60% de mortalidade nos animais. Estudos subseqüentes mostraram que ratos hepatectomizados apresentaram redução de cerca de 44% de colágeno hepático e os ratos saudáveis estimulados por FH (40mg/Kg durante sete dias) mostraram 37% de redução. O uso de FH, em conjunto com a insulina e o glucagon pela via intraperitoneal durante 10 dias mostraram que o fígado intacto responde adequadamente aos fatores nutricionais (GUERRA et al., 2009). O hormônio tireoideano T₃ também mostrou ser um importante fator para aumentar a massa hepática, apesar do alto índice de mortalidade (50 a 70%) (PARRA et al., 1992, 1994, 1995, 1996). Sabe-se que o aumento da massa hepática observada por Parra et al. (1992, 1994, 1995, 1996) e Guerra et al. (2009), durante 10 dias com FH poderia ter várias aplicações como estimular o crescimento do fígado antes ou depois do transplante entre vivos, acelerar o processo de regeneração hepática após hepatectomia parcial (COGLIATI et al., 2004a; MIRANDA et al., 2005), ou mesmo diminuir a síntese de colágeno em fígados com fibrose ou cirróticos (PEREIRA et al., 2003; HERNANDEZ-BLASQUEZ et al., 2005).

A regeneração hepática é atribuída à proliferação de hepatócitos seguida de HP parcial acompanhada da secreção de um grande número de fatores de crescimento e citocinas como a IL-6, TNF e HGF (FAUSTO; WEBER, 1993; RAMADORI; ARMBRUST, 2001; FAUSTO; CAMPBELL; RIEHLE, 2006). As células parenquimatosas (hepatócitos – autócrina) e não parenquimatosas (células de Kupfer, células de Ito e células endoteliais sinusoidais (CES) – parácrina) estão envolvidas na regeneração hepática e podem secretar fatores de crescimento e citocinas, como descritos anteriormente (MICHALOPOULOS, 2007; DUNCAN; DORREL; GROMPE, 2009). No entanto, o mecanismo de regeneração é complexo, as CES são sensíveis a mudanças bruscas no fluxo sanguíneo, estreitamente associada com a microcirculação hepática, estabilidade do meio ambiente interno, de vital importância como fonte de nutrientes, fatores de crescimento para a proliferação de hepatócitos, pela formação de novos vasos sanguíneos, bem como a produção de óxido nítrico (NO). Tais características sugeriram serem estas células

essenciais para a função hepática (LIMMER et al., 2000; LIMMER; KNOLLE, 2001; MATSUMOTO et al., 2001; XU et al., 2003; LECOUTER et al., 2003; NEDREDAL et al., 2003; MENDOZA; VIDAL-VANACLOCHA, 2003; PING et al., 2006). Estas citocinas e radicais livres poderiam desenvolver papel importante na fase inicial da proliferação, assim como no término do processo regenerativo (MALIK; SELDEN; HODGSON, 2002).

A via intrínseca resulta de aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e liberação de moléculas pró-apoptóticas para o citoplasma (HUA et al., 1988). Nos experimentos realizados para a avaliação do potencial elétrico da membrana mitocondrial pela rodamina 123 em cultura de hepatócitos mostraram a influência dos FH no *status* metabólico dos hepatócitos. Estes resultados em conjunto aos dados obtidos das fases do ciclo celular confirmam o potencial biológico dos FH na manutenção, diferenciação e maturação dos hepatócitos. A rodamina 123 foi responsável pela coloração das mitocôndrias dos hepatócitos realizada sem que ocorresse o processamento por vesículas de endocitose ou por lisossomos; estes dados corroboram aos obtidos no teste de citotoxicidade pelo PI obtidos por citometria de fluxo.

Nas membranas mitocondriais e citoplasma encontram-se também as moléculas anti-apoptóticas, cuja produção é estimulada por fatores de crescimento. Essas proteínas reguladoras da apoptose fazem parte da família Bcl-2 (*B-cell lymphoma*) (HUA et al., 1988). Quando os níveis de Bcl-2 e membros da família como Bcl-XL diminuem a permeabilidade da membrana mitocondrial aumenta e muitas proteínas ativadoras da cadeia proteolítica passam da mitocôndria para o citoplasma, condições estas que foram detectadas precocemente nos experimentos do potencial elétrico da membrana mitocondrial dos hepatócitos cultivados na presença dos FH que modularam nestas condições experimentais positivamente e preventivamente a indução de morte celular, possivelmente por apoptose.

Na fase de execução da apoptose ocorre ativação das endonucleases, quebra da cromatina nuclear e do citoesqueleto. Há fragmentação da célula com a formação de corpos apoptóticos, constituídos de citoplasma, restos de organelas e fragmentos nucleares (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Os resultados da expressão dos marcadores do citoesqueleto, CK-8, 18 e desmina mantiveram-se expressos nos períodos de 24 e 72 horas nas culturas tratadas com os FH nas concentrações de 1 e 10X, sugerem que esses marcadores permanecem expressos

no arranjo dos microfilamentos e filamentos intermediários do citoesqueleto em células viáveis, o que não sinalizariam para a morte por apoptose.

Moolten, Oakman e Bucher (1970) e Ekberg et al. (1992) demonstraram que a administração de hormônio de crescimento (GH) ou de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) – peptídeo mitogênico com atividade promotora de crescimento e diferenciação de tecidos, além dos efeitos metabólicos semelhantes aos da insulina (BENNETT et al., 1983; WANG et al., 1991) aumenta a síntese de ADN, e Baruch et al. (1993) concluíram que na regeneração hepática a taxa de hormônio de crescimento ligado à proteína está aumentada (MOOLTEN; OAKMAN; BUCHER, 1970; BARUCH et al., 1993; EKBERG et al., 1992). Os IGFs são encontrados na circulação associados a proteínas e há muito pouco IGF livre (f IGF) (STYNE, 1998). Apesar de não avaliado isoladamente neste trabalho, os efeitos da insulina e do GH, de seus receptores ou vias de sinalização, deve ser considerado na indução de proliferação desses fatores presentes na solução de FH utilizada na suplementação do meio para o cultivo dos hepatócitos. O sistema IGF inclui os ligantes IGF-I e IGF-II, os receptores (tipo 1 e 2 de IGF, IGF-IR e IGF-IIR, respectivamente), as proteínas ligadoras de IGF (IGFBP1 a 6) e as proteínas intracelulares sinalizadoras associadas ao IGF-IR, que incluem os membros da família do IRS (*insulin-receptor substrate*), AKT, mTOR (*target of rapamicina*) e a S6K (*S6 kinase*) (CLEMMONS, 1998; JONES; CLEMMONS, 1995; FIRTH; BAXTER, 2002; TATAR; BARTKE; ANTEBI, 2003).

O fígado é o responsável pela síntese da maior concentração circulante de IGFs e IGFBPs, mas essas substâncias também podem ser localmente secretadas em outros órgãos por ação autócrina ou parácrina (CLEMMONS, 1998). Outro fator indutor de proliferação que poderia influenciar a capacidade proliferativa dos hepatócitos tratados com FHs, supostamente são produzidos após a estimulação destas células com os FH, que auxiliam numa segunda etapa de ativação a resposta proliferativa. Como descrito por Clemmons (1998) os hepatócitos produzem localmente IGF e IGFBP com efeitos potenciais proliferativos. Estudos *in vitro* e em animais sugerem que os componentes do ciclo celular inibem a apoptose tanto por ação direta com outros fatores de crescimento como por ação indireta, interagindo com outros sistemas moleculares intracelulares envolvidos na promoção e/ou progressão da proliferação (CASTRO; SPINOLA; GUERRA-JÚNIOR, 2005).

A adição dos fatores hepatotróficos 48 e 72 horas às culturas de hepatócitos em todas as concentrações utilizadas aumentou a capacidade de síntese (S) (Tabelas 7 e 8), quando comparadas às culturas mantidas 24 horas (Tabela 6). Possivelmente, em resposta aos estímulos proliferativos observados nos ensaios de viabilidade celular pelo teste colorimétrico-MTT e na capacidade do potencial da membrana mitocondrial. Esses dados corroboram e suportam as informações de Parra et al. (1995) é possível modificar a relação de proporção do fígado com o peso do corpo do animal, com aumento do tamanho do fígado causado pela infusão intraperitoneal de FH, tais como a glicose, aminoácidos, insulina, glucagon, vitaminas, eletrólitos e triiodotironina (T3) e que a suplementação com fatores de crescimento promovem o aumento da capacidade regenerativa de lesões hepáticas parciais em modelos experimentais.

As funções metabólicas e a cinética de absorção e depuração avaliadas pelo verde de indocianina, como as enzimas transaminases dos hepatócitos *in vitro* mostraram que a adição dos FH nas diferentes concentrações não altera sua capacidade funcional até 72 horas de cultivo. Esta metodologia avaliada nesta tese ressalta a viabilidade da adição dos fatores hepatotróficos na manutenção, função e na capacidade proliferativa deste tipo celular mantido em culturas primárias. Não ocorreram modificações expressivas no potencial funcional, como também na manutenção da diferenciação e maturação dos hepatócitos após a adição das diferentes concentrações dos FH. O perfil da absorção e depuração *in vitro* do verde de indocianina nestes hepatócitos não foi modificada.

A absorção e depuração hepática do verde de indocianina ocorrem por meio de dois importantes processos; pela captação através da membrana plasmática dos sinusóides com alta média de extração e pela remoção dos hepatócitos por meio do transporte citoplasmático via ATP dependente (FAYBIK; HETZ, 2006) e exclusiva excreção biliar sem ocorrer conjugação intra-hepática ou circulação enterohepática (SHINOHARA et al., 1996). O verde de indocianina é distribuído no volume plasmático sem distribuição extravascular e removido exclusivamente pelo fígado para dentro da bile sem biotransformação (WHEELER; CRANSTON; MELTZER, 1958; CHERRICK et al., 1960). A enzima glutatione-S-transferase (GST alpha) é a proteína que carrega a ICG nos hepatócitos (SATO et al., 1992). Após injeção intravenosa, o verde de indocianina é ligado a proteínas do plasma, primariamente a albumina, é rapidamente absorvido pelo fígado e então excretada sem alterações

pela bile. Metabolicamente os FH adicionados não alteraram a função hepática como também não modificaram o potencial enzimático exclusivo das vias hepáticas e biliares que neste projeto foram avaliadas quantitativamente pelas transaminases e no armazenamento da amilase.

O VIC é carregado no plasma ligado a lipoproteínas e excretado exclusivamente pelo fígado dentro da bile sem sofrer modificações metabólicas (ADACHI et al., 1995). Experimentos realizados por Yamada et al. (2002) indicaram não haver efeitos adversos na viabilidade celular nesta concentração, estes dados corroboram com os ensaios de viabilidade celular pelo MTT e de citotoxicidade pelo PI obtidos pela citometria de fluxo após a adição dos FH

A quantidade de excreção biliar e a média de excreção do VIC na bile refletem o nível hepático de ATP, o que também possivelmente reflete o potencial da membrana mitocondrial. Ainda, a determinação da excreção biliar do verde de indocianina contribui de forma precisa para avaliar o nível energético hepático antes de cirurgia em pacientes com icterícia obstrutiva (NISHIDA et al., 2000). Portanto, a mensuração direta da absorção e depuração hepática do verde de indocianina fornece um adequado instrumento para avaliação das funções hepáticas (SHINOHARA et al., 1996).

Entre as transformações enzimáticas e químicas que compõem o metabolismo normal dos organismos vivos, encontram-se a formação dos radicais livres e os mecanismos enzimáticos e não enzimáticos que combatem estas espécies altamente reativas. O equilíbrio entre a produção e o combate de radicais livres é essencial para manter a integridade das estruturas moleculares das proteínas, lipídios, carboidratos, nucleotídeos necessárias para a homeostase metabólica. A peroxidação lipídica induzida por radicais livres é um dos danos moleculares mais expressivos do processo metabólico degenerativo molecular.

Agentes tóxicos xenobióticos ou metabólitos intermediários são fatores que aumentam a produção de radicais livres nos organismos vivos, podendo levar ao estresse oxidativo. Na formação de radicais livres pela peroxidação lipídica dos lipídios insaturados na membrana celular, o Malonaldeído (MDA) é um dos principais produtos, níveis elevados de MDA indicam injúrias nos hepatócitos. O MDA é o produto desta peroxidação, pois através dele são mensuradas as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O aumento destas espécies está relacionado ao

aumento da peroxidação de lipídeos e ao dano oxidativo (DRAPER; HADLEY, 1990; HU et al., 2000).

Os fatores hepatotróficos na concentração de 1X, adicionados às culturas primárias de hepatócitos nos períodos de 24 e 48 horas inibiram a formação de radicais livres, derivados do ácido tiobarbitúrico (0,94 e 3,48nmol/mL, respectivamente), isto é, protegeram a membrana celular da peroxidação lipídica, demonstrando uma ação protetora das células, uma vez que o aumento do potencial antioxidante reduz a disponibilidade de radicais livres, beneficiando a cultura celular (Gráfico 15 A e B). Os fatores hepatotróficos aumentaram significativamente a produção de radicais peroxidados lipídicos poliinsaturados em sobrenadantes de cultura primária de hepátocitos.

A peroxidação dos lipídios das membranas celulares é apenas um exemplo de lesão biológica que pode ser promovida pelos radicais livres, uma vez que praticamente todas as biomoléculas são suscetíveis à oxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Os resultados mostraram que as concentrações 1X e 5X induziram a produção de radicais peroxidados após 72 horas, enquanto que a concentração 10X mostrou-se inicialmente após 24 horas de cultura, um potente indutor. São hipóteses que podem ser ressaltadas nesta modulação é o balanço entre o estímulo proliferativo, a capacidade de resposta a este estímulo, o consumo energético (potencial da membrana mitocondrial), a manutenção da viabilidade celular e a diferenciação demonstrando sua capacidade inibitória da proliferação).

Para se protegerem contra oxidações os organismos dispõem de mecanismos químicos e enzimáticos. Neste sistema de cultivo celular a adição de componentes presentes na solução de fatores hepatotróficos, como a vitamina C, o ácido fólico, o ácido glutâmico, a nicotinamida são potentes antioxidantes e, possivelmente em conjunto modulam as respostas proliferativas dos hepatócitos. Outro aspecto que poderia ser abordado é a interação destes componentes como mediadores de vias de sinalização como segundos mensageiros, por exemplo, as vias dependentes de cálcio, o fosfatidilinositol e o AMP cíclico.

A glutathione reduzida (GSH) desempenha um papel importante no metabolismo da célula, a diferenciação, a proliferação e na apoptose e como resultado, nos distúrbios em sua homeostase (BALLATORI et al., 2009a,b,c). OS FH foram preventivos na indução de morte por apoptose, expressão de marcadores de citoesqueleto, que além de manterem a integridade dos receptores de

diferenciação de hepatócitos ao serem fosforilados induzem apoptose, ou ainda deve-se ressaltar a manutenção do sistema enzimático após os diferentes períodos de cultura celular. Um dos fatores que poderiam contribuir para a manutenção da capacidade proliferativa e metabólica nas culturas de hepatócitos cultivado na presença de FH poderiam ser providos da atividade da GSH.

A proporção da atividade da GSH pode refletir no ambiente oxirredutor intracelular, ambiente que é determinante na função celular, incluindo a diferenciação (CHÉNAIS et al., 2000; HENMI et al., 2001, SMITH; DAVIES; MCBRIDE, 2000; ANSELMO; COBB, 2004; ARDITE et al., 2004; KIM; SABATINI, 2004; HUH et al., 2004) proliferação e na apoptose (GHIBELLI et al., 1995; HALL, 1999; VOEHRINGER, 1999); afetar o sinal de transdução (STAAL et al., 1990; SUZUKI et al., 1997; BLACKBURN; PODGORSKI; BULLA, 1999), expressão do gene (ARRIGO, 1999; HAMMOND, 2001), na modulação da função de proteínas (STAAL et al., 1994; em canais de íons e bombas, proteínas mitocondrial, bem como proteínas do citoesqueleto (ZIEGLER, 1985; DALLE- DONNE et al., 2007; GHEZZI; DI SIMPLICIO, 2007; LILLIG; BERNDT; HOLMGREN, 2008; SHELTON; MIEYAL, 2008). A citometria de fluxo é um recurso emergente na medicina veterinária que permite uma análise rápida, objetiva e quantitativa de células em suspensão (FALDYNA et al., 2001). O citômetro de fluxo é um aparelho utilizado para avaliação da emissão de fluorescência das células (FACS – *Fluorescence Activated Cell Sorter*), como na separação física de células, de acordo com as características citométricas (CHAUDRI et al., 1999; WILKERSON, 2004).

A citometria de fluxo foi o instrumento utilizado para a determinação da expressão de marcadores do citoesqueleto como a citoqueratina e a desmina. As citoqueratinas são proteínas estruturais importantes das células epiteliais e exibem a maior heterogeneidade dentre todas as proteínas dos filamentos intermediários, constituem uma forma de filamento protéico intermediário (7-11nm) presente no citoplasma das células eucarióticas, que permite o suporte mecânico para as células e seus núcleos (OSBORN; WEBER, 1982). A sua ocorrência em uma determinada célula varia segundo o tipo histológico, período de desenvolvimento embrionário, estado de diferenciação, meio de crescimento e estado patológico (MOLL; MOLL; WIEST, 1982; MOLL et al., 1982; SUN et al., 1983; CRIBIER; GROSSHANS, 1993; SMACK; KORGE; JAMES, 1994). Neste estudo estes marcadores foram acompanhados após a adição de 1X e 5X dos FH, sendo que os resultados obtidos

mostraram uniformidade em sua expressão. A expressão das citoqueratinas durante o desenvolvimento embrionário do fígado por imunoistoquímica demonstrou que as células epiteliais no fígado em desenvolvimento apresentam citoqueratina 8 e 18 durante o período de embriogênese (DESMET, 1985; SHAH; GERBER, 1989; STOSIEK; KASPER; KARSTEN, 1990), razão pela qual utilizamos a citoqueratina CK-8 e CK-18 para a caracterização do tipo celular e no estadios de maturação celular. A citoqueratina 8 e 18 tem um papel fundamental nas vias centrais da apoptose. É uma cisteína protease responsável pela quebra e empacotamento de componentes celulares para a regulação e reparo do ADN.

A importância e relevância dos modelos experimentais para o estudo dos efeitos das drogas imunossupressoras sobre a regeneração e remodelação do parênquima hepático têm-se mostrado de grande interesse a utilização destes modelos na regeneração hepática. Na literatura verifica-se que os dois modelos mais utilizados são aqueles *in vivo* com ratos jovens ou adultos e modelos de cultivo de hepatócitos *in vitro*. A importância dos modelos experimentais, bem como a implementação dos métodos moleculares e imunoistoquímicos utilizados ensejam estudos futuros sobre os diversos mecanismos envolvidos e sobre a ação de novas drogas, suplementação nutricional, terapias gênica e celular na regeneração hepática (TANNURI, 2007; TANNURI; TANNURI, 2008).

O modelo experimental *in vitro*, utilizado no desenvolvimento desta tese mostrou-se eficaz para avaliar a ação de fatores hepatotróficos, como fatores de crescimento em hepatócitos, nos aspectos concernentes à sua proliferação, metabolismo e ciclo celular. Os FH mantiveram viáveis os hepatócitos ao longo do período de cultura sem promover efeitos citotóxicos, alterações metabólicas ou em sua capacidade de proliferação. Não foram observadas alterações celulares, morfológicas e funcionais nas diferentes concentrações de FH. Marcadores de proliferação, seus reguladores e do citoesqueleto específicos para os tipos celulares provenientes do parênquima hepático mostraram-se informativos, e nas condições experimentais desenvolvidas nesta tese foram importantes para a caracterização dos estadios de diferenciação celular. Essas informações poderão ser úteis, como ferramenta para o aprimoramento de terapêuticas adjuvantes e/ou nutricionais em animais ou em seres humanos acometidos por distúrbios degenerativos oclusivos e proliferativos.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas culturas primárias sob a ação dos FH em diferentes concentrações mostraram que:

- ✓ a adição dos fatores hepatotróficos nas diferentes concentrações utilizadas promoveu crescimento e expansão de culturas primárias de hepatócitos até 72 horas de cultivo;
- ✓ os fatores hepatotróficos nas concentrações 1X e 5X induziram, após 48 horas, a produção de radicais lipídicos peroxidados, enquanto a concentração de 10X foi um potente indutor de radicais lipídicos peroxidados a partir de 24 horas de cultura;
- ✓ a síntese de colágeno total foi estimulada após 24 horas da adição dos FH nas concentrações 1X e 5X, enquanto que a adição de 10X mostrou-se com menor capacidade de estímulo;
- ✓ os FH em todas as concentrações foram capazes de aumentar a síntese, bem como a progressão nas fases do ciclo celular, aumentando a capacidade proliferativa nos períodos de 24 e 48 horas, e diminuindo após 72 horas de cultivo;
- ✓ os FH induziram, de acordo com a concentração, o aumento na proporção de células mortas por necrose, prevenindo a apoptose; e
- ✓ este modelo *in vitro* permitiu a manutenção das funções metabólicas dos hepatócitos, como a cinética de absorção e depuração, síntese de transaminases, integridade de viabilidade celular e expressão de marcadores do citoesqueleto, utilizados como indicadores da diferenciação e maturação de hepatócitos normais.

Referências

REFERÊNCIAS

- ADACHI, M.; SUEMATSU, S.; KONDO, T.; OGASAWARA, J.; TANAKA, T.; YOSHIDA, n.; NAGATA, S. Targeted mutation in the *Fas* gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. **Nature Genetics**, v. 11, p. 294-300, 1995.
- ADDREIS, P. G.; WHITFIELD, D. J. E.; ARMATO, U. Stimulation of DNA synthesis and mitosis of hepatócito in primary cultures of neonatal rat liver by arachidonic acid and prostaglandins. **Experimental Cell Research**, v. 134, p. 265-272, 1981
- AKCALI, K. C.; DALGIC, A.; UCAR, A.; HAJ, K. B.; GUVENC D. expression of bcl-2 gene family during resection induced liver regeneration: comparison between hepatectomized and sham groups. **World Journal of Gastroenterology**, v. 10, n. 2, p. 279-283, 2004.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 4th ed. New York: Garland Science, 2002.
- ALBRECHT, J. H.; HOFFMAN, J. S.; KREN, B. T.; STEER, C. J. Cyclin and cyclin-dependent kinase 1mRNAexpression in models of regenerating liver and human liver diseases. **American Journal of Physiology**, v. 265, p. G857-G864, 1993.
- ALBRECHT, J. H.; POON, R. Y.; AHONEN, C. L.; RIELAND, B. M.; DENG, C.; CRARY, G. S. Involvement of p21 and p27 in the regulation of CDK activity and cellcycle progression in the regenerating liver. **Oncogene**, v. 16, p. 2141-2150, 1998.
- ALISON, M. R. Regulation of hepatic growth. **Physiological Review**, v. 66, p. 499-541, 1986.
- ALISON, M. R.; GOLDING, M.; SARRAF, C. E.; EDWARDS, R. J.; LALANI, E. N. Liver damage in the rat induces hepatocyte stem cells from biliary epithelial cells. **Gastroenterology** , v. 110, p. 1182-1190, 1996.
- ALISON, M. R.; POULSOM, R.; JEFFERY, R.; DHILLON, A. P.; QUAGLIA, A.; JACOB, J.; NOVELLI, M.; PRENTICE, G.; WILLIAMSON, J.; WRIGHT, N. A. Hepatocytes from nonhepatic adult stem cells. **Nature**, v; 406, p. 257, 2000.
- ALISON, M. R.; VIG, P.; RUSSO, F.; BIGGER, B. W.; AMOFAH, E.; THEMIS, M.; FORBES, S. Hepatic stem cells: from inside and outside the liver? **Cell Proliferation**, v. 37, n. 1, p. 1-21, 2004.
- ANKOMA-SEY, V. Hepatic regeneration-revisiting the myth of prometheus. **News in Physiological Sciences**, v. 14, p. 149-155, 1999.
- ANSELMO, A. N.; COBB, M. H. Protein kinase function and glutathionylation. **Biochemistry Journal**, v. 381, Pt. 3, p. 1-2, 2004.

ARBER, N.; ZAJICEK, G.; ARIEL, I. The streaming liver II. Hepatocyte life history. **Liver**, v. 8, p. 80-87, 1988.

ARDITE, E.; BARBERA, J. A.; ROCA, J.; FERNÁNDEZ-CHECA, J. C. Glutathione depletion impairs myogenic differentiation of murine skeletal muscle C2C12 cells through sustained NF-kappaB activation. **American Journal Pathology**, v. 165, n. 3, p. 719-728, 2004.

ARGAST, G. M.; CAMPBELL, J. S.; BROOLING, J. T, FAUSTO N. 2004. Epidermal growth factor receptor transactivation mediates tumor necrosis factor-induced hepatocyte replication. **Journal Biology Chemistry**, v. 279, p. 34530-34536, 2004.

ARIAS, I. M.; JAKOBY, W. B.; POPPER, H.; SCHACTER, D.; SHAFRITZ, D. A. (Ed.). **The liver: biology and pathobiology**. 2. ed. New York: Raven Press, 1988, p. 833-850.

ARMATO, U.; ANDREIS, P. G. Prostaglandins of the F series are extremely powerful growth factors for primary neonatal rat hepatócito. **Life Science**, v. 33, p. 1745-1755, 1983.

ARRIGO, A. P. Gene expression and the thiol redox state. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 9-10, p. 936-944, 1999. Review.

ASAHINA, K.; SATO, H.; YAMASAKI, C.; KATAOKA, M.; SHIOKAWA, M.; KATAYAMA, S.; TATENO, C.; YOSHIKAWA, K. A. Pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule as a mitogen of rat hepatocytes and its role in regeneration and development of liver. **Journal Pathology**, v. 160, n. 6, p. 2191-2195, 2002.

ASAKAWA, K.; HIZUKA, N.; TAKANO, K.; HORIKAWA, R.; SUKEGAWA, I.; TOYODA, C.; SHIZUME, K. Human growth hormone stimulates liver regeneration in rats. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 12, n. 5, p. 343-347, 1989.

ASHKENAZI, A. Targeting death and decoy receptors of the tumor: necrosis factor superfamily. **Nature reviews Cancer**, v. 2, n. 6, p. 420-430, 2002.

AVRUCH, J.; LIN, Y.; LONG, X.; MURTHY, S.; ORTIZ-VEGA, S. Recent advances in theregulation of the TOR pathway by insulin and nutrients. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 8, p. 67-72, 2005.

AZZARONE, A.; FRANCAVILLA, A.; CARRIERI, G.; GASBARRINI, A.; SCOTTI-FOGLIENI, C.; FAGIUOLI, S.; CILLO, U.; ZENG, Q. H.; STARZL, T. E. Effects on in vivo and in vitro hepatocyte proliferation of methylprednisolone, azathioprine, mycophenolic acid, mizoribine and prostaglandin E1. **Transplantation Proceedings**, v. 24, n. 6, p. 2868-2871, 1992.

BACHEM, M. G.; MEYER, D. M.; MELCHIOR, R.; SELL, K. M.; GRESSNER, A. M. Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblast-like cells – a potential mechanism of self-perpetuation in liver fibrogenesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 89, p. 19-27, 1992.

BADER, G.; LEIEUNE, S.; MESSNER, M. Reduction of cyclosporine-induced gingival overgrowth following a change to tacrolimus. A case history involving a liver transplant patient. **Journal of Periodontology**, v. 69, n. 6, p. 729-732, 1998.

BAGHERI, S. C.; BECKLEY, M. L.; FARISH, S. E. Acute acetaminophen toxicity: report of a case. **Journal of the California Dental Association**, v. 29, n. 9, p. 687-689, 2001.

BAGHERI, S. C.; BECKLEY, M. L.; FARISH, S. E. Acute acetaminophen toxicity: report of a case. **Journal of the California Dental Association**, v. 29, n. 9, p. 687-690, 2001.

BAKER, A. L. Hepatotrophic factors: basic concepts and clinical implications. **Acta Medica Scandinavica. Supplementum**, v. 703, p. 201, 1985.

BALLATORI, N.; KRANCE, S. M.; MARCHAN, R.; HAMMOND, C. L. Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, n. 1-2, p. 13-28, 2009a.

BALLATORI, N.; KRANCE, S. M.; MARCHAN, R.; HAMMOND, C. L. Molecular aspects of medicine. **Biological Chemistry**, v. 390, n. 3, p. 191-214, 2009c.

BALLATORI, N.; KRANCE, S. M.; NOTENBOOM, S.; SHI, S.; TIEU, K.; HAMMOND, C. L. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **Biological Chemistry**, v. 390, p. 191-214, 2009b.

BARATTA, B.; RIZZOLI, R.; GALLIANI, I.; VITALE, M. Early events of liver regeneration in rats: a multiparametric analysis. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 105, n. 1, p. 61-79, 1996.

BARBASON, H.; HERENS, C.; ROBAYE, B.; MILIS, G.; SULON, J.; BOUZAHZAH, B.; VANCANTFORT, J. Importance of cell kinetics rhythmicity for the control of cell proliferation and carcinogenesis in rat liver (review). **In Vivo**, v. 9, p. 539-548, 1995.

BARRA, G. B.; VELASCO, L. F. R.; PESSANHA, R. P.; CAMPOS, A. M.; MOURA, F. N.; POLIKARPOV, I.; RIBEIRO, R. C. J.; SIMEONI, L. A.; NEVES, F. A. R. Mecanismo molecular da ação do hormônio tireoideano. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 48, n. 1, p. 25-39, 2004.

BARUCH, Y.; AMIT, T.; HERTZ, P.; ENAT, R.; SHOSHANY, G.; YODIM, M. B. H.; HOCHBERG, Z. Growth hormone-binding. Protein in partially hepatectomized rats. **Hormone Research**, v. 40, n. 5-6, p. 173-177, 1993.

BAUMAN, D. E. Bovine somatotropin: review of an emerging animal technology. **Journal Dairy Science**, v. 75, p. 3432-3451, 1992.

BAUMAN, D. E.; CURRIE, W. B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 9, p. 1514-1529, 1980.

- BAYRAKTAR, M.; VAN THIEL, D. H. Abnormalities in measures of liver function and injury in thyroid disorders. **Hepatogastroenterology**, v. 44, p. 1614-1618. 1997.
- BENEL, L.; RNOT, X.; KORRTPROBST, M.; ADOLPHE, M.; MOUNOLOU, J. C. Mitochondria1 Uptake of Rhodamine 123 by Rabbit Articular Chondrocytes. **Cytometry**, v. 7, n. 3, p. 281-285, 1986.
- BENNETT, A.; WILSON, D. M.; LIU, F.; NAGASHIMA, R.; ROSENFELD, R. G.; HINTZ, R. L. Levels of insulin-like growth factors I and II in human cord blood. **Clinics in Endocrinology and Metabolism**, v. 57, n. 3, p. 609-612, 1983.
- BERASAIN, C.; GARCIA-TREVIJANO, E. R.; CASTILLO, J.; ERROBA, E.; LEE, D. C.; PRIETO, J.; AVILA, M. A. Amphiregulin: An early trigger of liver regeneration in mice. **Gastroenterology**, v. 128, p. 424-432, 2005.
- BIANCO, A. C. Impact of gene cloning, disruption and over-expression of iodothyronine deiodinase on thyroid hormone homeostasis. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 402-411, 2002.
- BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; GRECA, F. H.; SMANIOTTO, G. H.; TECHY, F.; SOARES, D. P.; KANNENBERG, C.; CASTRO, C. C. L.; VASCONCELOS, C. N. Effect of histamin on liver regeneration: experimental study on rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, [serial online]. v. 15, n. 1, 2000a. Disponível em: <URL: <http://www.scielo.br/acb>>. Acesso em: 20 ago. 2009.
- BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; MATIAS, J. E. F.; MARTONE, D.; BARBOSA, R. F.; OGAWA, G. H. Influência da glutamina na regeneração hepática. **Revista Medica**, (São Paulo), v. 86, n. 4, p. 219-223. 2007.
- BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; MATIAS, J. E. F.; MONTIBELLER, G. R.; SIQUEIRA, L. C. D.; NUNES, E. S.; GRASSI, C. A. Efeitos do envelhecimento na regeneração hepática em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 197-202, 2006.
- BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; PANTE, M. L.; GARCIA, R. F.; MACEDO, V. L.; MORAES, T. H. C.; BOELL, P. Hormônio de crescimento na regeneração hepática em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia**, v. 27, n. 2, p. 117-120, 2000b.
- BIRKENKAMP, K. U.; COFFER, P. J. Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, Pt. 1, p. 292-297, 2003.
- BIRKHAHN, R. H.; AWAD, S.; THOMFORD, N. R. Parenteral monoacetoacetin and liver regeneration interaction after partial hepatectomy in the rat. **JPEN. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 18, n. 3, p. 219-224, 1994.
- BISSELL, D. M.; CARON, J.; BABISS, L. E.; FRIEDMAN, J. M. Transcriptional regulation of the albumin gene in cultured rat hepatocytes. Role of basement-membrane matrix. **Molecular Biology & Medicine**, v. 7, n. 2. p. 187-197, 1990.

- BLACKBURN, M. L.; PODGORSKI, I.; BULL, A. W. Specific protein targets of 13-oxooctadecadienoic acid (13-OXO) and export of the 13-OXO-glutathione conjugate in HT-29 cells.. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1440, n. 2-3, p. 225-234, 1999.
- BLINDENBACHER, A.; WANG, X.; LANGER, I.; SAVINO, R.; TERRACCIANO, L.; HEIM, M. H. Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice. **Hepatology**, v. 38, p. 674-682, 2003.
- BLOUIN, A.; BOLENDER, R. P.; WEIBEL, E. R. Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and non-hepatocytes in the rat liver parenchyma. **Journal of Cell Biology**, v. 72, n. 2, p. 441-455, 1977.
- BOR, M. V.; SORENSEN, B. S.; VINTER-JENSEN, L.; FLYVBJERG, A.; PEDERSEN, S. B.; NEXO, E. Epidermal growth factor and insulin-like growth factor I upregulate the expression of the epidermal growth factor system in rat liver. **Journal of Hepatology**, v. 32, n. 4, p. 645-654, 2000.
- BOROWIAK, M.; GARRATT, A. N.; WUSTEFELD, T.; STREHLE, M.; TRAUTWEIN, C.; BIRCHMEIER, C. Met provides essential signals for liver regeneration. **Proceedings National Academy Sciences of the United States America**, v. 101, p. 10608-10613, 2004.
- BRAET, F.; DE ZANZER, R.; SASAQGER, R.; SASAOKI, T.; BAEKELAND, M.; JANSSENS, P.; SMEDSROD, B.; WISSE, E. Assessment of method of isolation, purification, and cultivation of rat liver sinusoidal endothelial cells. **Laboratory Investigation**, v. 70, n. 6, p. 944-952, 1994.
- BRANDÃO, D. F.; RAMALHO, L. N. Z.; RAMALHO, F. S.; ZUCOLOTO, S.; MARTINELLI, A. L. C.; CASTRO E SILVA, O. de. Liver cirrhosis and hepatic stellate cells1. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, 2006. Suplemento, 1. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502006000700013>. Acesso em: 20 ago. 2008.
- BRAUN, L.; MEAD, J. E.; PANZICA, M.; MIKUMO, R.; BELL, G. I.; FAUSTO, N. Transforming growth factor beta mRNA increases during liver regeneration: a possible parácrino mechanism of growth regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, p. 1539-1543, 1988.
- BRENNER, D. A.; KOCH, K. S.; LEFFERT, H. L. Transforming growth factor- α stimulates proto-oncogene c-jun expression and a mitogenic program in primary cultures of adult rat hepatócito. **DNA Cell Biology**, v. 8, p. 279-285, 1989.
- BUCHER, N. L. Insulin, glucagon, and the liver. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 15, p. 221-230, 1976.
- BUCHER, N. L. R. Regeneration of the mammalian liver. **International Review of Cytology**, v. 15, p. 245-300, 1963.
- BUCHER, N. L. R.; PATEL, U.; COHEN, S. Hormonal factors concerned with regeneration. In: PORTER, R.; WHELAN, J. **Hepatotrophics factors**. Amsterdam: Elsevier, Excerpta Medica, 1978. p. 95-107. (Ciba Foundation Symposium).

- BUCHER, N. L. R.; SWAFFIELD, M. N. The rate of incorporation of labeled thymidine into the deoxyribonucleic acid of regenerating rat liver in relation to the amount of liver excised. **Cancer Research**, v. 240, p. 1611-1625, 1964
- BUCHER, N. L.; WEIR, G. C. Insulin, glucagon, liver regeneration, and DNA synthesis. **Metabolism**, v. 25, p. 1423-1425, 1976.
- BUSUTTIL, R. W.; KLINTMALM, G. B. **Transplantation of the liver**. Philadelphia: W.B.Saunders, 1996.
- CALLERY, M. P.; MANGINO, M. J.; FLYE, M. W. Kupffer cell prostaglandin-E2 production is amplified during hepatic regeneration. **Hepatology**, v. 14, p. 368-372, 1990.
- CANALESE, J.; GOVE, C. D.; GIMSON, A. E.; WILKINSON, S. P.; WARDLE, E. N.; WILLIAMS, R. Reticuloendothelial system and hepatocytic function in fulminant hepatic failure. **Gut**, v. 23, n. 4, p. 265-269, 1982.
- CANZANELLI, A.; RAPPORT, D.; GUILD, R. Control of liver regeneration and nucleic acid content by the thyroid, with observations on the effects of pyrimidines. **American Journal Physiology**, v. 157, p. 225-233, 1949.
- CARVER, R. S.; STEVENSON, M. C.; SCHEVING, L. A.; RUSSELL, W. E. Diverse expression of ErbB receptor proteins during rat liver development and regeneration. **Gastroenterology**, v. 123, n. 6, p. 2017-2027, 2002.
- CASTRO E SILVA, J. R. O.; CENEVIVA, R.; FERREIRA, A. L.; FOSS, M. C.; DE-LUCCA, E. L. Liver trophism in dogs made diabetic by total pancreatectomy or alloxan administration. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 20, p. 269-276, 1987.
- CASTRO, A. M.; SPINOLA, E.; GUERRA-JÚNIOR, G. GH/IGF e neoplasia: o que há de novo nesta associação. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 49, p. 5, p. 833-842, 2005.
- CHAN, K.; KOST, D. P.; MICHALOPOULOS, G. Multiple sequential periods of DNA synthesis and quiescence in primary hepatocyte cultures maintained on the DMSO-EGF on/off protocol. **Journal Of Cellular Physiology**, v. 141, n. 3, p. 584-590, 1989.
- CHAN, K.; KOST, D. P.; MICHALOPOULOS, G. Multiple sequential periods of DNA synthesis and quiescence in primary hepatocyte cultures maintained on the DMSO-EGF on/off protocol. **Journal of Cellular Physiology**, v. 141, n. 3, p. 584-590, 1989.
- CHANDA, S.; MEHENDALE, H. M. Nutritional modulation of the final outcome of hepatotoxic injury by energy substrates: an hypothesis for the mechanism. **Medical Hypotheses**, v. 46, n. 3, p. 261-268, 1996

- CHAUDRI, Z.; BARTLET-JONES, M.; PANAYOTOU, G.; KLONISCH, T.; ROITT, I.; LUND, T.; DELVES, P. Dual specificity antibodies using a double-stranded oligonucleotide bridge. **FEBS Letters**, v. 450, n. 1-2, p. 23-26, 1999.
- CHEN, C. C.; YOUNG, J. L.; MONZON, R. I.; CHEN, N.; TODOROVIC, V.; LAU, L. F. Cytotoxicity of TNFalpha is regulated by integrin-mediated matrix signaling. **EMBO Journal**, v. 26, p. 1257-1267, 2007.
- CHÉNAIS, B.; ANDRIOLLO, M.; GUIRAUD, P.; BELHOUSSINE, R.; JEANNESSON, P. Oxidative stress involvement in chemically induced differentiation of K562 cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, n. 1, p. 18-27, 2000.
- CHERRICK, G. R.; STEIN, S. W.; LEEVY, C. M.; DAVIDSON, C. S. Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. **Journal Clinical Investigation**, v. 39, p. 592-600, 1960.
- CHU, P. G.; WEISS, L. M. Keratin expression in human tissues and neoplasms. **Histopathology**, v. 40, p. 403-39, 2002.
- CLEMMONS, D. R. Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 140, p. 19-24, 1998.
- COELHO, M. C. M.; TANNURI, U.; TANNURI, A. C. A.; MELLO, E. S.; SANTOS, N. A. S. R. dos. Expression of interleukin-6 and apoptosis-related genes in suckling and weaning rat models of hepatectomy and liver regeneration. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 42, p. 613-709, 2007.
- COGLIATI, B.; PEREIRA, H. M.; PARRA, O. M.; SILVA, J. R. M. C.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Avaliação da proliferação celular hepática após a administração de fatores hepatotróficos em ratos hepatectomizados. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12., 2004a, Ribeirão Preto. **Anais...** 1 CDROM. 2004a.
- COGLIATI, B.; PEREIRA, H. M.; PARRA, O. M.; SILVA, J. R. M. C.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Effect of the treatment with hepatotrophic factors on the liver of rats (Wistar) with experimentally induced fibrosis. In: REUNIÃO ANNUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL – FESBE, 19., 2004b, Águas de Lindóia. **Anais...** 1 CDROM. 2004b.
- COGLIATI, B.; PEREIRA, H. M.; PARRA, O. M.; SILVA, J. R. M. C.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Morphometry of collagen and the reticular fibers on the extracellular hepatic matrix after the injection of hepatectomized rats. In: REUNIÃO ANNUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL – FESBE, 19., 2004c, Águas de Lindóia. **Anais...** 1 CDROM. 2004c.
- CORMACK, D. H. **Fundamentos de histologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2003, p. 371.
- CORNELL, R. P. Gut-derived endotoxin elicits hepatotrophic factor secretion for liver regeneration. **American Journal of Physiology**, v. 249, p. R551-R562, 1985.
- CORPECHOT, C.; BARBU, V.; WENDUM, D.; KINNMAN, N.; REY, C.; POUPON, R.; HOUSSET, C.; ROSMORDUC, O. Hypoxia-induced VEGF and collagen I

expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. **Hepatology**, v. 35, p. 1010–1021, 2002.

COSTA, A.; SMORLESI, L. Il ripristino del fegato e la reversione rapida della cirrosi da CCl₄ dopo asportazione di larga parte del fegato cirrótico. **Archivio "de Vecchi" per L'Anatomia Patologica e la Medicina Clinica**, v. 16, p. 49-70, 1951.

COUTANT, A.; RESCAN, C.; GILOT, D.; LOYER, P.; GUGUEN-GUILLOUZO, C.; BAFFET, G. PI3K-FRAP/mTOR pathway is critical for hepatocyte proliferation whereas MEK/ERK supports both proliferation and survival. **Hepatology**, v. 36, p. 1079-1088, 2002.

CRESSMAN, D. E.; DIAMOND, R. H.; TAUB, R. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. **Science**, v. 274, n. 5291, p. 1379-1383, 1996.

CRIBIER, H.; GROSSHANS, E. Les cytokeratines dans la peau et les muqueuses malphiennes. **Annales Dermatologie Vénéréologie**, v. 120, p. 327-335, 1993.

CRUISE, J. L.; COTECCHIA, S.; MICHALOPOULOS, G. K. Norepinephrine decreases EGF binding in primary rat hepatocyte cultures. **Journal of Cellular Physiology**, v. 127, p. 39-44, 1986.

CRUISE, J. L.; HOUCK, K. A.; MICHALOPOULOS, G. K. Induction of DNA synthesis in cultured rat hepatócito through stimulation of alpha-1 adrenoreceptor by norepinephrine. **Science**, v. 227, p. 749-751, 1985.

CRUISE, J. L.; KNECHTLE, S.; BOLLINGER, R.; KUHN, C.; MICHALOPOULOS, G. K. α_1 – Adrenergic effects and liver regeneration. **Hepatology**, v. 7, p. 1189-1194, 1987.

CRUISE, J. L.; MUGA, S. J.; LEE, Y. S.; MICHALOPOULOS, G. K. Regulation of hepatócito cell growth: alpha-1 adrenergic receptor and ras r21 changes in liver regeneration. **Journal of Cellular Physiology**, v. 140, p. 195-201, 1988.

DAHM, F.; GEORGIEV, P.; CLAVIEN, P. A. Small-for-size syndrome after partial liver transplantation: definition, mechanisms of disease and clinical implications. **American Journal Transplantation**, v. 5, n. 11, p. 2605-2610, 2005.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; COLOMBO, R.; MILZANI, A. S-glutathionylation in protein redox regulation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, n. 6, p. 883-898, 2007.

DAVEAU, M.; SCOTTE, M.; FRANÇOIS, A.; COULOUARN, C.; ROS, G.; TALLET, Y.; HIRON, M.; HELLOT, M-F.; SALIER, J-P. Hepatocyte growth factor, transforming growth facto alpha, and their receptor as combined markers of prognosis in hepatocellular carcinoma, **Molecular Carcinogenesis**, v. 36, n. 3, p. 130-141, 2003.

DAVIS, P. J.; DAVIS, F. B. Nongenomic actions of thyroid hormone. **Thyroid**, New York, v. 6, n. 5, p. 497-504, oct. 1996.

DEBONERA, F.; ALDEGUER, X.; SHEN, X.; GELMAN, A. E.; GAO, G.; QUE, X.; GREENBAUM, L. E.; FURH, E. E.; TAUB, R.; OLTHOFF, K. M. Activation of interleukin-6/STAT3 and liver regeneration following transplantation, **Journal of Surgical Research**, v, 96, n. 2, p. 289-295, 2001.

DESBARATS, J.; NEWELL, M. K. Fas engagement accelerates liver regeneration after partial hepatectomy. **Nature Medicine**, v. 6, n. 8, p. 920-923, 2000.

DESMET, V. J. Intrahepatic bile ducts under lens. **Journal of Hepatology**, v. 1, p. 545-559, 1985.

DESMET, V. J.; GERBER, M.; HOOFNAGLE, J. H.; MANNS, M.; SCHEUER, P. J. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. **Hepatology**, v. 19, n. 6, p. 13-30, 1994.

DEVEY, J. J.; CROWE, D. T. Microenteral nutrition. In: BONAGURA, J. D. **Kirk's current veterinary therapy. XIII. Small animal practice**. Philadelphia: Saunders, 2000. p. 136-140.

DIEHL, A. M.; RAI, R. Review: regulation of liver regeneration by pro-inflammatory cytokines. **Journal Gastroenterology Hepatology**, v. 11, n. 5, p. 466-470, 1996.

DOUGLAS, C. R. Fisiologia da glândula tireóide. In: _____. **Tratado de fisiologia aplicado à saúde**. 5. ed. São Paulo: Robe, 2002. p. 1211-1231.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 421-431, 1990.

DRAHOTA, Z.; RAUCHOVÁ, H.; SEDLÁK, V.; KOCI, J.; CERVINKOVÁ, Z. The effect of triiodothyronine on changes of membrane fluidity in regenerating rat liver. **Physiological Research**, v. 48, n. 2, p. 167-170, 1999.

DUNCAN, A. W.; DORRELL, C.; GROMPE, M. Stem cells and liver regeneration. **Gastroenterology**, v. 137, p. 466-481, 2009.

ECKSTEIN, L. A.; VAN QUILL, K. R.; BUI, S. K.; UUSITALO, M. S.; O'BRIEN, J. M. Cyclosporin a inhibits calcineurin/nuclear factor of activated T-cells signaling and induces apoptosis in retinoblastoma cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 46, n. 3, p. 782-790, 2005.

EKBERG, S.; LUTHER, M.; NAKAMURA, T.; JANSSON, J. O. Growth hormone promotes early of hepatocyte growth factor gene expression in the liver of hypophysectomized rats after partial hepatectomy. **Journal Endocrinology**, v. 135, p. 59-67, 1992.

ELLIOTT, J. I.; EWCHAND, H.; ALTMANN, D. M. Streptozotocin-induced diabetes in mice lacking β cells. **Clinical Experimental Immunology**, Bethesda, USA, v. 109, p. 116-120, 1997.

ESCOBAR, G. M. The role of thyroid hormone in fetal neurodevelopment. **Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, v. 14, p. 1453-1462, 2001. Supplement, 6.

ESCRIBANO, O.; FERNÁNDEZ-MORENO, M. D.; PINA, M. J.; FUEYO, J.; MENOR, C.; ROMÁN, I. D.; GUIJARRO, L. G. Pretreatment with FK506 upregulates insulin receptors in regenerating rat liver. **Hepatology**, v. 36, n. 3, p. 555-561, 2002.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Textbook veterinary internal medicine**. 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997. v. 2, 302 p.

EVARTS, R. P.; NAGY, P.; MARSDEN, E.; THORGEIRSSON, S. S. A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. **Carcinogenesis**, v. 8, p. 1737-1740, 1987.

EXTON, J. H. Role of phosphoinositides in the regulation of liver function. **Hepatology**, v. 8, n. 1, p. 152-166, 1988.

FALDYNA, M.; LEVÁ, L.; KNÖTIGOVÁ, P.; TOMAN, M. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs--a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 82, n. 1-2, p. 23-37, 2001.

FARBER, J. L.; GERSON, R. J. Mechanisms of cell injury with hepatotoxic chemicals. **Pharmacological Reviews**, v. 36, p. 71S-75S, 1984.

FARISH, E.; ROLTON, H. A.; BARNES, J. F.; FLETCHER, C. D.; WALSH, D. J.; SPOWART, K. J.; HART, D. M. Lipoprotein (a) and postmenopausal oestrogen. **Acta Endocrinologica**, v. 129, p. 225-228, 1993.

FAUSTO, N. New perspectives on liver regeneration. **Hepatology**, v. 6, p. 326-327, 1986.

FAUSTO, N. Growth factors in liver development, regeneration and carcinogenesis. **Progress in Growth Factor Research**, v. 3, n. 3, p. 219-234, 1991.

FAUSTO, N. Hepatic regeneration. In: ZAKIM, D.; BOYER, T. D. **Hepatology. A textbook of liver disease**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1990. p. 49-65.

FAUSTO, N. Liver regeneration and repair: Hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. **Hepatology**, v. 39, p. 1477-1487, 2004.

FAUSTO, N. Liver regeneration. **Journal Hepatology**, v. 32, p. 19-31, 2000. Supplement, 1.

FAUSTO, N.; CAMPBELL, J. S. The role of hepatocytes and oval cells and liver regeneration. **Mechanisms of Development**, v. 120, p. 117-130, 2003.

FAUSTO, N.; CAMPBELL, J. S.; RIEHLE, K. J. Liver regeneration. **Hepatology**, v. 43, p. S45-S53, 2006. Supplement, 1.

FAUSTO, N.; LAIRD, A. D.; WEBBER, E. M. Liver Regeneration 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 15, p. 1527-1536, 1995.

FAUSTO, N.; MEAD, J. E. Regulation of liver growth: protooncogenes and transforming growth factors. **Laboratory Investigation**, v. 60, p. 4-13, 1989.

FAUSTO, N.; MEAD, J. E.; BRAUN, L.; THOMPSON, N. L.; PANZICA, M.; GOYETTE, M.; BELL, G. I.; SHANK, P. R. Proto-oncogene expression and growth factors during liver regeneration. **Symposium on Fundamental Cancer Research**, v. 39, p. 69-86, 1986.

FAUSTO, N.; THOMPSON, N. L.; BRAUN, L. Purification and Culture of Oval Cells from Rat Liver. In: PRETLOW, T. G.; PRETLOW, T. P. (Ed.). **Cell separation: methods and selected applications**. New York: Academic Press, 1987. v. 4, p. 45-77.

FAYBIK, P.; HETZ, H. Plasma disappearance rate of indocyanine green in liver dysfunction. **Transplantation Proceedings**, v. 38, n. 3, p. 801-802, 2006.

FIRTH, S. M.; BAXTER, R. C. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. **Endocrine Reviews**, v. 23, p. 824-854, 2002.

FLADMARK, K. E.; GJERTSEN, B. T.; MOLVEN, A.; MELLGREN, G.; VINTERMYR, O. K.; DOSKELAND, S. O. Gap junctions and growth control in liver regeneration and in isolated rat hepatócito. **Hepatology**, v. 25, n. 4, p. 847-855, 1997.

FLEIG, W. E.; HOSS, G. Partial purification of rat hepatic stimulator substance and characterization of its action on hepatoma cells and normal hepatócito. **Hepatology**, v. 9, p. 240-248, 1989.

FLOYD JR., J. C.; FAJANS, S. S.; CONN, J. W.; KNOFF, R. F.; RULL, J. Stimulation of insulin secretion by amino acids. **Journal Clinical Investigation**, v. 45, p. 1487-1502, 1966.

FORHEAD, A. J.; LI, J.; SAUNDERS, J. C.; DAUNCEY, M. J.; GILMOUR, R. S.; FOWDEN, A. L. Control of ovine hepatic growth hormone receptor and insulin-like growth factor I by thyroid hormones in utero. **American Journal Physiology**, v. 278, n. 6, p. E1166-E1174, 2000.

FOXWELL, B. M.; WOERLY, G.; RYFFEL, B. Inhibition of interleukin 4receptor expression on human lymphoid cells by cyclosporin. **European Journal of Immunology**, v. 20, n. 5, p.1185-1186, 1990.

FRANCAVILLA, A.; GAVALER, J. S.; MAKOWKA, L.; BAROONE, M.; MAZZAFERRO, V.; AMBROSINO, G.; IWATSUKI, S.; GUGLIELMI, F. W.; DiLEO, A.; BALESTRAZZI, A.; VANTHIEL, D. H.; STARZL, T. E. Estradiol and testosterone levels in patients undergoing partial hepatectomy. A possible signal for hepatic regeneration? **Digestive Diseases and Sciences**, v. 34, p. 818-822, 1989a.

FRANCAVILLA, A.; OVE, P.; POLIMENO, L.; SCIASCIA, C.; COETZEE, M. L.; STARZL, T. E. Epidermal growth factor and proliferation in rat hepatócito in primary

culture isolated at different times after partial hepatectomy. **Cancer Research**, v. 46, p. 1318-1323, 1986.

FRANCAVILLA, A.; PANELLA, C.; POLIMENO, L.; GIANGASPERO, A.; MAZZAFERRO, V.; PAN, C. E.; VAN THIEL, D. H.; STARZL, T. E. Hormonal and enzymatic parameters of hepatic regeneration in patients undergoing major liver resections. **Hepatology**, v. 12, n. 5, p. 1134-1138, 1990.

FRANCAVILLA, A.; POLIMENO, L.; BARONE, M.; AZZARONE, A.; STARZL, T. E. Hepatic regeneration and growth factors. **Journal of Surgical Oncology Supplement**, v. 3, p. 1-7, 1993.

FRANCAVILLA, A.; POLIMENO, L.; DILEO, A.; BARONE, M.; OVE, P.; COETZEE, M.; EAGON, P.; MAKOWKA, L.; AMBROSINO, G.; MAZZAFERRO, V.; STARZL, T. E. The effect of estrogen and tamoxifen on hepatocyte proliferation in vivo and vitro. **Hepatology**, v. 9, p. 614-620, 1989b.

FRANCAVILLA, A.; STARZL, T. E.; BARONE, M.; ZENG, Q.; PORTER, K. A.; ZEEVI, A.; MARKUS, P. M.; VAN, DEN BRINK, M. R. M.; TODO, S. Studies on mechanisms of augmentation of liver regeneration by cyclosporine and FK 506. **Hepatology**, v. 14, n. 1, p. 140-143, 1991a.

FRANCAVILLA, A.; STARZL, T. E.; CARR, B.; AZZARONE, A.; CARRIERI, G.; ZENG, Q. H.; PORTER, K. A. The effects of FK 506, cyclosporine, and rapamycin on liver growth in vitro and in vivo. **Transplantation Proceedings**, v. 23, p. 2817-2820, 1991b.

FRANCAVILLA, A.; STARZL, T. E.; PORTER, K.; SCOTTIFOGLIENI, C.; MICHALOPOULOS, G. K.; CARRIERI, G.; TREJO, J.; AZZARONE, A.; BARONE, M.; ZENG, Q. H. Screening for candidate hepatic growth factors by selective portal infusion after canine Eck's fistula. **Hepatology**, v. 14, n. 4, pt. 1, p. 665-670, 1991c.

FRESHNEY, N. W.; RAWLINSON, L.; GUESDON, F.; JONES, E.; COWLEY, S.; HSUAN, J.; SAKLATVALA, J. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 1039-1049, 1994.

FRIEDMAN, J. R.; LARRIS, B.; LE, P. P.; PEIRIS, T. H.; ARSENLIS, A.; SCHUG, J.; TOBIAS, J. W.; KAESTNER, K. H.; GREENBAUM, L. E. Orthogonal analysis of C/EBPbeta targets in vivo during liver proliferation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 12986-12991, 2004.

FUJII, H.; HIROSE, T.; OE, S.; YASUCHIKA, K.; AZUMA, H.; FUJIKAWA, T.; et al. Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. **Journal Hepatology**, v. 36, p. 653-659, 2002.

FUJIWARA, K.; NAGOSHI, S.; OHNO, A.; HIRATA, K.; OHTA, Y.; MOCHIDA, S.; TOMIYA, T.; HIGASHIO, K.; KUROKAWA, K. Stimulation of liver growth by exogenous human hepatocyte growth factor in normal and partially hepatectomized rats. **Hepatology**, v. 18, n. 6, p. 1443-1449, 1993.

- FUKUHARA, Y.; HIRASAWA, A.; LI, X. K.; KAWASAKI, M.; FUJINO, M.; FUNESHIMA, N.; KATSUMA, S.; SHIOIMA, S.; YAMADA, M.; OKUYAMA, T.; SUZUKI, S.; TSUIMOTO, G. Gene expression profile in the regenerating rat liver after partial hepatectomy. **Journal of Hepatology**, v. 38, n. 6, p. 784-792, 2003.
- FURTADO, A. J. L. **Aspectos cirúrgicos da regeneração hepática**. 1964. Tese (Doutoramento) – Faculdade de Medicina de Coimbra, Coimbra, 1964.
- FURUTA, K.; KAKITA, A.; TAKAHASHI, T.; TOMIYA, T.; FUJIWARA, K. Experimental study on liver regeneration after simultaneous partial hepatectomy and pancreatectomy. **Hepatology Research**, v. 17, n. 3, p. 223-236, 2000.
- GALANTI, G.; PUCHETTI, V. La nostra esperienza nel trattamento della cirrosi mediante resezione epatica. **Chirurgia e Patologia Sperimentale**, v. 8, p. 1487-1497, 1960.
- GARCIA, S. C.; LOPES, L. S.; SCHOTT, K. L.; BECK, S. T.; POMBLUM, V. J. Ciclosporina A e Tacrolimus: uma revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 6, p. 393-401, 2004.
- GARTNER, L. P.; HIAT, L. P. **Tratado de histologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, p. 456.
- GAULDIE, J.; RICHARDS, C.; BAUMANN, H. IL6 and the acute phase reaction. **Research Immunology**, v. 143, n. 7, p. 755-759, 1992.
- GAYOTTO, L. C. C.; ALVES, V. A. F. (Ed.). **Gayotto - Doenças do fígado e vias biliares**. São Paulo; Atheneu; 2001. 664 p.
- GERBER, M. A.; THUNG, S. N.; SHEN, S.; STROHMEYER, F. W.; ISHAK, K. G. Phenotypic characterization of hepatic proliferation. Antigenic expression by proliferation epithelial cells in fetal liver, massive hepatic necrosis and nodular transformations of the liver. **American Journal of Pathology**, v. 110, p. 70-74, 1983.
- GHEZZI, P.; DI SIMPLICIO, P. Glutathionylation pathways in drug response. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7, n. 4, p. 398-403, 2007.
- GHIBELLI, L.; COPPOLA, S.; ROTILIO, G.; LAFAVIA, E.; MARESCA, V.; CIRIOLO, M. R. Non-oxidative loss of glutathione in apoptosis via GSH extrusion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 216, n. 1, p. 313-320, 1995.
- GILLER, G.; SINGLER, K. Oxidative stress and living cells. **Folia Microbiologica**, v. 40, n. 2, p. 131-152, 1995.
- GIVAN, A. L.; FISHER, J. L.; WAUGH, M.; ERNSTOFF, M. S.; WALLACE, P. K. A flow cytometric method to estimate the precursor frequencies of cells proliferating in response to specific antigens. **Journal Immunology Methods**, v. 230, n. 1-2, p. 99-112, 1999.

- GOGGIN, M. M.; NELSEN, C. J.; KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S.; MORLEY, S. J.; ALBRECHT, J. H. Rapamycin-sensitive induction of eukaryotic initiation factor 4F in regenerating mouse liver. **Hepatology**, v. 40, p. 537-544, 2004.
- GOODMAN, H. M. A glândula tireóide. In: JOHNSON, L. R. (Ed.). **Fundamentos da fisiologia médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 437-448.
- GORLA JUNIOR, J. A.; FAGUNDES, D. J.; PARRA, O. M.; ZAIA, C. T. B. V.; BANDEIRA, C. O. P. Fatores hepatotróficos e regeneração hepática. Parte II: fatores de crescimento / Hepatotrophic factors and liver regeneration. Part II: growth factors. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 16, n. 4, p. 261-266, 2001.
- GOUSTIN, A. S.; LEOF, E. B.; SHIPLEY, G. D.; MOSES, H. L. Growth factors and cancer. **Cancer Research**, v. 46, p. 1015-1029, 1986.
- GUERRA, R. R.; TROTTA, M. R.; PARRA, O. M.; AVANZO, J. L.; BATEMAN, A.; ALOIA, T. P.; DAGLI, M. L.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Modulation of extracellular matrix by nutritional hepatotrophic factors in thioacetamide-induced liver cirrhosis in the rat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 11, p. 1027-1034, 2009.
- GUMUCIO, J. J.; MILLER, D. L. Functional implications of liver cell heterogeneity. **Gastroenterology**, v. 80, p. 393-403, 1981.
- GUPTA, B. L.; AZAN, M.; BAQUER, N. Z. Changes in erythrocytes glutathione peroxidase and glutathione reductase in alloxan diabetes. **Biochemistry International**, v. 21, p. 725-731, 1990.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Os hormônios metabólicos da tireóide. In: _____. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 802-812.
- HALL, J. M.; MCDONNELL, D. P. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. **Endocrinology**, v. 140, n. 12, p. 5566-5578, 1999.
- HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? **Cardiovascular Research**, v. 47, p. 410-418, 2000.
- HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989 GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Iron toxicity and oxygen radicals. **Baillière's Clinical Haematology**, v. 2, n. 2, p. 195-256, 1989.
- HAMMOND, G. Immunization: Must be safe or we will all be sorry. **The Canadian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 11-12, 2001.
- HANDELMANN, G. E.; RUSSELL, J. T.; GAINER, H.; ZERBE, R.; BAYORH, M. Vasopressin administration to neonatal rats reduces antidiuretic response in adult kidneys. **Peptides**, v. 4, n. 6, p. 827-832, 1983.

HANEY, A.; PEACOCK JR., E. E.; MADDEN, J. W. Liver regeneration and hepatic collagen deposition in rats with dimethylnitrosamine-induced cirrhosis. **Annals Surgery**, v. 175, p. 863-869, 1972.

HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **Journal Immunol Methods**, v. 119, p. 203-210, 1989.

HASHIMOTO, M.; KOTHARY, P. C.; ECKHAUSER, F. E.; RAPER STEVEN, E. Treatment of cirrhotic rats with epidermal growth factor and insulin accelerates liver DNA synthesis after partial hepatectomy. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, n. 1, p. 1259-1265, 1998.

HASSAN, H. T.; ZANDER, A. Stem cell factor as a survival and growth factor in human normal and malignant hematopoiesis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 95, n. 3-4, p. 257-262, 1996.

HAUSSINGER D, LAMERS WH, MOORMAN AF. Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of amino acids and ammonia. **Enzyme**, v. 46, p. 72-93, 1992.

HAYES, J. M. The immunobiology and clinical use of current immunosuppressive therapy for renal transplantation. **Journal of Urology**, v. 149, p. 437-443, 1993.

HENMI, K.; TSUBOI, S.; DEMURA, T.; FUKUDA, H.; IWABUCHI, M.; OGAWA, K. I. A possible role of glutathione and glutathione disulfide in tracheary element differentiation in the cultured mesophyll cells of *Zinnia elegans*. **Plant & Cell Physiology**, v. 42, n. 6, p. 673-676, 2001.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento, por métodos laboratoriais**. 19. ed. São Paulo: Manole, 1996. 1552 p.

HIB, J. **Di fiore histologia texto e atlas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

HIGASHIYAMA, H.; YAMAGUSHI, T.; MORI, K.; NAKANO, Y.; YOKOYAMA, T.; YAMAMOTO, N.; YAMAOKA, Y.; TANAKA, K.; KUMADA, K.; OZAWA, K. Graft size assessment by preoperative computed tomography in living related partial liver transplantation. **The British Journal of Surgery**, v. 80, n. 4, p. 489-492, 1993.

HIGGINS, G. M. Experimental pathology of the liver. XII. Effects of feeding dessicated thyroid gland on restoration of the liver. **Archives of Pathology**, v. 16, p. 226-231, 1933.

HIGGINS, G. M.; ANDERSON, R. M. Experimental pathology of the liver: I Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. **Archives of Pathology**, v. 12, p. 186-202, 1931.

HOCKINGS, P. D.; ROBERTS, T.; CAMPBELL, S. P.; REID, D. G.; GREENHILL, R. W.; POLLEY, S. R.; NELSON, P.; BERTRAM, T. A.; KRAMER K. Longitudinal magnetic resonance imaging quantitation of rat liver regeneration after partial hepatectomy. **Toxicological Pathology**, v. 30, n. 5, p. 606-610, 2002.

HOLECEK, M. Nutritional modulation of liver regeneration by carbohydrates, lipids, and amino acids: a review. **Nutrition**, v. 15, n. 10, p. 784-788, 1999.

HORST, C.; ROKOS, H.; SEITZ, H. J. Rapid stimulation of hepatic oxygen consumption by 3,5-di-iodo-L-thyronine. **The Biochemical Journal**, v. 261, p. 945-950, 1989.

HOUCK, K. A.; CRUISE, J. L.; MICHALOPOULOS, G. Norepinephrine modulates the growthinhibitory effect of transforming growth factor-beta in primary rat hepatocyte cultures. **Journal Cell Physiology**, v.135, p. 551-555, 1988.

HOUCK, K. A.; MICHALOPOULOS, G. K. Altered responses of regenerating hepatócito to norepinephrine and transforming growth factor-b. **Journal Cell of Physiology**, v. 141, p. 503-509, 1989.

HOUCK, K. A.; MICHALOPOULOS, G. K. STROM, S. C. Introduction of a Ha-ras oncogene into rat liver epithelial cells and parenchymal hepatocytes confers resistance to the growth inhibitory effects of TGF-beta. **Oncogene**, v. 4, n. 1 p. 19-25, 1989.

HOUCK, K. A.; ZARNEGAR, R.; MUGA, S. J.; MICHALOPOULOS, G. K. Acidic fibroblast growth factor (HBGF-1) stimulates DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures. **Journal Cell Physiology**, v.143, p. 129-132, 1990.

HOUCK, P. C.; LUTHERER, L. O.Regulation of adrenal blood flow: response to hemorrhagic hypotension. **American Journal Physiology**, v. 241, n. 6, p. H872-H877, 1981.

HU, Y. Y.; LIU, C. H.; WANG, R. P.; LIU, C.; LIU, P; ZHU, D. Y. Protective actions of salvianolic acid A on hepatocyte injured by peroxidation in vitro. **World Journal of Gastroenterology**, v. 6, n. 3, p. 402-404, 2000.

HUA, C.; ZORN, S.; JENSEN, J. P.; COUPLAND, R. W.; KO, H. S.; WRIGHT, J. J.; BAKHSHI, A. Consequences of the t(14;18) chromosomal translocation in follicular lymphoma: deregulated expression of a chimeric and mutated BCL-2 gene. **Oncogene Research**, v. 2, n. 3, p. 263-275, 1988.

HUANG, C. S., HE, W.; MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Amino acid sequence of rat kidney glutathione synthetase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 1232-1236, 1995.

HUANG, M. J.; LIAW, Y. F. Clinical associations between thyroid and liver diseases. **Gastroenterologia y Hepatologia**, v. 10, n. 3, p. 344-350, 1995.

HUFNAGL, K.; LÖW-BASELLI, A.; ROSSMANITH, W.; WAGNER, A.; RUTTKAY-NEDECKY, B.; BURSCH, W.; MÜLLAUER, L.; PARZEFALL, W.; GRASL-KRAUPP, B. Apoptosis and hepatocarcinogenesis. In: JIRTLE, R. L. editor. **Liver regeneration and carcinogenesis. Molecular and cellular mechanisms**. San Diego: Academic Press,1995. p. 141-78.

HUH, C. G.; FACTOR, V. M.; SANCHEZ, A.; UCHIDA, K.; CONNER, E. A.; THORGEIRSSON, S. S. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is

required for efficient liver regeneration and repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 4477-4482, 2004.

ISLAMI, A. H.; PACK, G. T.; HUBBARD, J. C. Regenerative hyperplasia of the cirrhotic liver following partial hepatectomy. **Cancer**, v. 11, p. 663-686, 1958.

IWAI, M.; CUI, T. X.; KITAMURA, H.; SAITO, M.; SHIMAZU, T. Increased secretion of tumor necrosis factor and interleukin 6 from isolated, perfused liver of rats after partial hepatectomy. **Cytokine**, v. 13, p. 60-64, 2001.

JAMES, R.; BRADSHAW, R. A. Polypeptide growth factors. **Annual Review of Biochemistry**, v. 53, p. 259-292, 1984.

JESUS, R. P.; WAITZBERG, D. L.; TORRINHAS, R. S. M. M.; BERTEVELLO, P.; NONOGAKI, S. Effect of glutamine dipeptide on hepatic regeneration in partially hepatectomized malnourished rats. **Nutrition**, v. 19, n. 11, p. 930-936, 2003.

JESUS, R. P.; WAITZBERG, D. L.; CAMPOS, F. G. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 242-254, 2000.

JIANG, Y. P.; BALLOU, L. M.; LIN, R. Z. Rapamycin-insensitive regulation of 4e-BP1 in regenerating rat liver. **Journal Biology Chemistry**, v. 276, p. 10943-10951, 2001.

JOHNSON, L. V.; WALSH, M. L.; BOCKUS, B. J.; CHEN, L. B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 2, p. 990-994, 1980.

JOHNSON, L. V.; WALSH, M. L.; BOCKUS, B. J.; CHEN, L. B. Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. **THE Journal of Cell Biology**, v. 88, p. 526-535, 1981.

JOHNSTON, D. G.; JOHNSON, G. A.; ALBERTI, K. G. Hepatotrophic factors: implications for diabetes mellitus. **Ciba Found Symposium**, v. 55, p. 357-373, 1977.

JONES, J. I.; CLEMMONS, D. R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrine Reviews**, v. 16, n. 1, p. 3-34, 1995.

JOO, E. H.; LEE, Y. B. No effect of diltiazem on the hepatic clearance of indocyanine green in the rats. **Archives of Pharmacology Research**, v. 21, n. 4, p. 411-417, 1998.

JUNGERMANN K. Zonal liver cell heterogeneity. **Enzyme**, v. 46, p. 1-32, 1992.

JUNGERMANN, K.; KIETZMANN, T. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. **Annual Review of Nutrition**, v. 16, p. 179-203, 1996.

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The Histochemical Journal**, v. 11, p. 447-455, 1979

- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2004, p. 488
- KAHN, D.; MAKOWKA, L.; LAI, H. Cyclosporine augments hepatic regenerative response in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 35, p. 392-395, 1990.
- KAMALI, P.; MÜLLER, T.; LANG, U.; CLAPP, J. .F. Cardiovascular responses of perimenopausal women to hormonal replacement therapy. 3rd. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 182, p.17-22, 2000.
- KAN, M.; HUAN, J.; MANSSON, P.; YASUMITSO, H.; CARR, B.; MCKEEHAN, W. Heparin-binding growth factor type 1 (acidic fibroblast growth factor): a potential biphasic autocrine and paracrine regulator of hepatocyte regeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p. 7432-7436, 1989.
- KAPLAN, L. A.; PESCE, A. J. **Clinical chemistry. Theory, analysis correlation**. Ed. St Louis, Missouri: Mosby-Year book, 1996.
- KARAVIAS, D. D.; TSAMANDAS, A. C.; KONSTANTINOS, T.; KRITIKOS, N.; KOURELIS, T.; RAVAZOULA, P.; VAGENAS, K.; SIASOS, K.; MIRRA, N.; BONIKOS, D. S. BCL-2 and bax expression and cell proliferation, after partial hepatectomy with and without ischemia, on cholestatic liver in rats: an experimental study. **Journal of Surgery Research**, v. 110, p. 399-408, 2003.
- KARRAN, S.; EAGLES, C. Regeneration. Part. 1. Physical aspects. In: WRIGHT, R.; ALBERTI, K. G. M. M.; KARRAN, S. **Liver and biliary disease**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1983, p. 197.
- KAZUO, H.; NISHIDA, T.; SEIYAMA, A.; UESHIMA, S.; HAMADA, E.; ITO, T.; MATSUDA, H. Recovery of blood flow and oxygen transport after temporary ischemia of rat liver. **American Journal Physiology**, v. 275, p. H243-H249, 1998. 1 Pt. 2.
- KERR J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972. Review.
- KIM, D. H.; SABATINI, D. M. Raptor and mTOR: subunits of a nutrient-sensitive complex. **Current Topics Microbiology Immunology**, v. 279, p. 259-270, 2004.
- KIM, T. H.; MARS, W. M.; STOLZ, D. B.; MICHALOPOULOS, G. K. Expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration. **Hepatology**, v. 31, p. 75-82, 2000.
- KIM, Y. I.; SALVINI, P.; AUXILIA, F.; CALNE, R. Y. Effect of cyclosporin A on hepatocyte proliferation after partial hepatectomy in rats: comparison with standard immunosuppressive agents. **American Journal of Surgery**, v. 155, n. 2, p. 245-249. 1998.
- KIRIMLIOGLU, H.; KIRIMLIOGLU, V.; YILMAZ, S.; COBAN, S.; TURKMEN, E.; ARA, C. Liver pathology and cell proliferation after calcineurin inhibitors and antiproliferative drugs following partial hepatectomy in rats. **Transplantation Proceedings**, v. 38, p. 622-626, 2006.

- KKWON, A. H.; INADA, Y.; UETSUJI, S.; YAMAMURA, M.; HIOKI, K.; YAMAMOTO, M. Response of fibronectin to liver regeneration after hepatectomy. **Hepatology**, v. 11, n. 4, p. 593-598, 1990.
- KLEIN, C.; WUSTEFELD, T.; ASSMUS, U.; ROSKAMS, T.; ROSE-JOHN, S.; MULLER, M.; MANNS, M. P.; ERNST, M.; TRAUTWEIN, C. The IL-6-gp130-STAT3 pathway in hepatocytes triggers liver protection in T cell-mediated liver injury. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, p. 860-869, 2005.
- KLIEWER, S. A.; UMESONO, K.; MANGELSDORF, D. J.; EVANS, R. M. Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. **Nature**, v. 355, n. 6359, p. 446-449, 1992.
- KNOPP, J.; MACHO, L.; FICKOVA, M.; ZORAD, S.; KVET, N. Y. R.; JARO, S. C. Insulin and catecholamines act at different stages of rat liver regeneration. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 827, p. 489-493, 1997.
- KÖNIG, E. H.; LIEBICH, H. Aparelho digestório. In: _____. **Anatomia dos animais domésticos**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 15-17.
- KOSTRUBSKY, V. E.; LEWIS, L. D.; STROM, S. C.; WOOD, S. G.; SCHUETZ, E. G.; SCHUETZ, J. D.; SINCLAIR, P. R.; WRIGHTON, S. A.; SINCLAIR, J. F. Induction of cytochrome P4503A by taxol in primary cultures of human hepatocytes. **American Journal of physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 355, n. 2, p. 131-136, 1998.
- KOUNTOURAS, J.; BOURA, P.; LYGIDAKIS, N. J. Liver regeneration after hepatectomy. **Hepatogastroenterology**, v. 48, n. 3, p. 556-562, 2001.
- KOVARIK, B. K.; HOYER, P. F.; ETTENGER, R.; PUNCH, J.; SOERGEL, M. Cyclosporine absorption profiles in pediatric kidney and liver transplant patients. **Pediatric Nephrology**, v. 18, n. 12, p. 1275-1279, 2003.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. (Ed.). **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**. 7. ed. Philadelphia: Elsevier, 2005.
- KWON, H. A.; UETSUJI, S.; YAMAMURA, M.; HIOKI, K.; YAMAMOTO, M. Effect of administration of fibronectin or aprotinin on liver regeneration after experimental hepatectomy. **Annals Surgery**, v. 211, n. 3, p. 295-300, 1990.
- LABRECQUE, D. R. Hepatic stimulator substance: discovery characteristics and mechanism of action. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 36, p. 669-673, 1991.
- LABRECQUE, D. R.; PESCH, L. A. Preparation and partial characterization of regenerative stimulator substance (SS) from rat liver. **Journal of Physiology**, v. 248, p. 273-284, 1975.
- LAI, H. S.; CHEN, W. J.; CHEN, K. M. Energy substrate for liver regeneration after partial hepatectomy in rats: effects of glucose vs fat. **Journal Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 16, n. 2, p.152-156, 1992.

LECOUTER, J.; MORITZ, D. R.; LI, B.; PHILLIPS, G. L.; LIANG, X. H.; GERBER, H. P.; KENNETH, J.; HILLAN, N.; F. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. **Science**, v. 299, p. 890-893, 2003.

LEDDA-COLUMBANO, G. M.; CURTO, M.; PIGA, R.; ZEDDA, A. I.; MENEGAZZI, M.; SARTORI, C.; SHINOZUKA, H.; BLUETHMANN, H.; POLI, V.; CILIBERTO, G.; COLUMBANO, A. In vivo hepatocyte proliferation is inducible through a TNF and IL-6-independent pathway. **Oncogene**, v. 17, p. 1039-1044, 1998.

LEDDA-COLUMBANO, G. M.; PIBIRI, M.; CONCAS, D.; COSSU, C.; TRIPODI, M.; COLUMBANO, A. Loss of cyclin D1 does not inhibit the proliferative response of mouse liver to mitogenic stimuli. **Hepatology**, v. 36, p. 1098-1105, 2002.

LEE, D. C.; SUNNARBORG, S. W.; HINKLE, C. L.; MYERS, T. J.; STEVENSON, M. Y.; RUSSELL, W. E.; CASTNER, B. J.; GERHART, M. J.; PAXTON, R. J.; BLACK, R. A.; CHANG, A.; JACKSON, L. F. TACE/ADAM17 processing of EGFR ligands indicates a role as a physiological convertase. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 995, p. 22-38, 2003.

LEEVY, C. M.; HOLLISTER, R. M.; SCHMID, R.; MACDONALD, R. A.; DAVIDSON, C. S. Liver regeneration in experimental carbon tetrachloride intoxication. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 102, p. 672-675, 1959.

LEFFERT, F. L.; KOCH, K. S. Proliferation of hepatócito. **Ciba Foundation Symposium**, v. 55, p. 61-82, 1977

LEFFERT, H. L.; KOCH, K. S. Proliferation of hepatócito. In: PORTER, R.; WHELAN, J. (Ed.). **Hepatotropic factors**. Amsterdam: Elsevier, North-Holland, 1978. p. 61-94. (Ciba Foundation Symposium n. 55).

LEFFERT, H. L.; KOCH, K. S.; LAD, P. J.; SHAPIRO, L. P.; SKELLY, H.; HEMPTINNE, B. Hepatocyte regeneration, replication, and differentiation. In: ARIAS, I. M.; LEFFERT, H. L.; KOCH, K. S.; MORAN, T.; RUBALCAVA, B. Hormonal control of rat liver regeneration. **Gastroenterology**, v. 76, p. 1470-1482, 1979.

LEHNINGER, A. E.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2002.

LEMIRE, J. M.; SHIOJIRI, N.; FAUSTO, N. Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine. **American Journal of Pathology**, v. 139, p. 535-552, 1991.

LEU, J. I.; CRISSEY, M. A.; CRAIG, L. E.; TAUB, R. Impaired hepatocyte DNA synthetic response posthepatectomy in insulin-like growth factor binding protein 1-deficient mice with defects in C/EBP beta and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase regulation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, p. 1251-1259, 2003.

LI, W.; LIANG, X.; KELLENDONK, C.; POLI, V.; TAUB, R. 2002. STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration. **Journal Biological Chemistry**, v. 277, p. 28411-28417, 2002.

- LILLIG, C. H.; BERNDT, C.; HOLMGREN, A. Glutaredoxin systems. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, n. 11, p. 1304-1317, 2008. Review.
- LIMA, É. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.
- LIMMER, A.; KNOLLE, P. A. Liver sinusoidal endothelial cells: a new type of organ-resident antigen-presenting cell. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 49, p. 7-11, 2001.
- LIMMER, A.; OHL, J.; KURTS, C.; LJUNGGREN, H. G.; REISS, Y.; GROETTRUP, M.; MOMBURG, F.; ARNOLD, B.; KNOLLE, P. A. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. **Nature Medicine**, v. 6, p. 1348-1354, 2000.
- LINDROOS, P. M.; ZARNEGAR, R.; MICHALOPOULOS, G. K. Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. **Hepatology**, v. 13, n. 4, p. 743-750, 1991.
- LIU, F.; LIU, Z. D.; WU, N.; CONG, X.; FEI, R.; CHEN, H. S.; WEI, L. Transplanted endothelial progenitor cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in rats. **Liver transplantation**, v. 15, n. 9, p. 1092-1100, 2009.
- LIVERINI, G.; IOSSA, S.; BARLETTA, A. Relationship between resting metabolism and hepatic metabolism: effect of hypothyroidism and 24 hours fasting. **Hormone Research**, v. 38, n. 3-4, p. 154-198, 1992.
- LORRAIN-SMITH, J. The pathological effects due to increase of oxygen tension in the air breathed. **Journal of Physiology**, v. 24, p. 19-35, 1899.
- LUETTEKE, N. C.; MICHALOPOULUS, G. K.; TEIXIDO, J.; GILMORE, R.; MASSAGUÉ, J.; LEE, D. C. Characterization of high molecular weight transforming growth factor- α produced by rat hepatocellular carcinoma cells. **Biochemistry**, v. 27, p. 6487-6494, 1988.
- MACMANUS, J. P.; BRACELAND, B. M.; YOUNDALE, T.; WHITFIELD, J. E. Adrenergic antagonists, and a possible link between the increase in cyclic adenosine 3', 5'- monophosphate and DNA synthesis during liver regeneration. **Journal Cellular Physiology**, v. 82, n. 2, p. 157-164, 1973.
- MAHER J. J. Cell-specific expression of hepatocyte growth factor in liver. Up-regulation in sinusoidal endothelial cells after carbon tetrachloride. **Journal Clinical Investigation**, v. 91, p. 2244-2252, 1993.
- MALIEKAL, T. T.; SUDHA, B.; PAULOSE, C. S. Kinetic parameters of Thymidine kinase and DNA synthesis during liver regeneration: role of thyroid hormones. **Life Science**, v. 60, n. 21, p. 1867-1874, 1997.
- MALIK, R.; HABIB, M.; TOOTLE, R.; HODGSON, H. Exogenous thyroid hormone induces liver enlargement, whilst maintaining regenerative potential--a study relevant

to donor preconditioning. **American Journal of Transplantation**, v. 5, n. 8, p. 1801-1807, 2005.

MALIK, R.; MELLOR, N.; SELDEN, C.; HODGSON, H. Triiodothyronine enhances the regenerative capacity of the liver following partial hepatectomy. **Hepatology**, v. 37, n. 1, p. 79-86, 2003.

MALIK, R.; SELDEN, C.; HODGSON, H. The role of non-parenchymal cells in liver growth. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 13, n. 6, p. 425-431, 2002.

MALL, F. P. A study of the structural unit of the liver. **American Journal Anatomy**, v. 5, p. 227-308, 1906.

MANGNALL, D.; BIRD, N. C.; MAJEED, A. W. The molecular physiology of liver regeneration following partial hepatectomy. **Liver International**, v. 23, p. 124-138, 2003.

MARCHIORO, T. L.; PORTER, K. A.; BROWN, B. .; FARIS, T. D.; HERRMANN, T. J.; SUDWEEKS, A.; STARZL, T. E. The specific influence of non-hepatic splanchnic venous blood flow on the liver. **Surgical Forum**, v. 16, p. 280-282, 1965.

MARCOS, A.; FISHER, R. A.; HAM, J. M.; SHIFFMAN, M. L.; SANYAL, A. J.; LUKETIC, V. A. C. ; STERLING R. K. ; FULCHER A. S. ; POSNER M. P. Liver regeneration and function in donor and recipient after right lobe adult to adult living donor liver transplantation. **Transplantation**, v. 69, n. 7, p. 1375-1379, 2000.

MARRA, F. Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. **Journal Hepatology**, v. 31, n. 6, p. 1120-1130, 1999. Review.

MARSDEN, E. R.; HU, Z.; FUJIO, K.; NAKATSUKASA, H.; THORGEIRSSON, S. S.; EVARTS, R. P. Expression of acidic fibroblast growth factor in regenerating liver and during hepatic differentiation. **Laboratory Investigation**, v. 67, 427-433, 1992.

MARTI, V.; BURWEN, S. J.; JONES, A. L. Biological effects of epidermal growth factor with emphasis on the gastrointestinal tract and liver: An update. **Hepatology**, v. 9, p. 126-138, 1989.

MARTIN, K. A.; BLENIS, J. Coordinate regulation of translation by the PI 3-kinase and mTOR pathways. **Advances Cancer Research**, v. 86, p. 1-39, 2002.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A.; AMENTA, P. S. The hepatic extracellular matrix. I. Components and distribution in normal liver. **Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology**, v. 423, n. 1, p. 1-11, 1993a.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A.; AMENTA, P. S. The hepatic extracellular matrix. II. Ontogenesis, regeneration and cirrhosis. **Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology**, v. 423, n. 2, p. 77-84, 1993b.

MASSON, S.; SCOTTÉ, M.; GARNIER, S.; FRANÇOIS, A.; HIRON, M.; TÉNIÈRE, P.; FALLU, J.; SALIER, J-P.; DAVEAU, M. Differential expression of apoptosis-

associated genes post-hepatectomy in cirrhotic vs. normal rats. **Apoptosis**, v. 5, n. 2, p. 173-179, 2000.

MATSUMOTO, K.; NAKAMURA, T. Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor. **Journal of Biochemistry**, v. 119, p. 591-600, 1996.

MATSUMOTO, K.; NAKAMURA, T. Hepatocyte growth factor: molecular structure, roles in liver regeneration, and other biological functions. **Critical Reviews Oncogenesis**, v. 3, p. 27-54, 1992.

MATSUMOTO, K.; YOSHITOMI, H.; ROSSANT, J.; ZARET, K. S. Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. **Science**, v. 294, p. 559-563, 2001.

MATSUNAMI, H.; KAWASAKI, S.; ISHIZONE, S.; HASHIKURA, Y.; IKEGAMI, T.; MAKUUCHI, M.; KAWARASAKI, H.; IWANAKA, T.; NOSE, A.; TAKEMURA, M. Serial changes of h-HGF and IL-6 in living related donor liver transplantation with special reference to their relationship to intraoperative portal blood flow. **Transplantation Proceedings**, v. 24, n. 5, p. 1971-1972, 1992.

MATSUO, T.; YAMAGUCHI, S.; MITSUI, S.; EMI, A.; SHIMODA, F.; OKAMURA, H. Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division *in vivo*. **Science**, v. 302, p. 255-259, 2003.

MAZZA, R. P. J.; BERTEVELLO, P. L.; MATOS, M. T. R. de ; NONOGAKI, S.; AVANCINI, F. A. V.; GAMA, R. J.; WAITZBERG, D. L. Effect of glutamine dipeptide on hepatic regeneration in partially hepatectomized malnourished rats. **Nutrition**, v. 19, n. 11-12, p. 930-935, 2003.

MCGOWAN, J. A.; STRAIN, A. J.; BUCHER, N. L. R. DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocyte in a defined medium: effects of epidermal growth factor, insulin, glucagon, and cyclic-AMP. **Journal of Cellular Physiology**, v. 180, p. 353-563, 1981.

MCGOWAN, J.; ATRYZEK, V.; FAUSTO, N. Effects of protein-deprivation on the regeneration of rat liver after partial hepatectomy. **Biochemical Journal**, v. 180, p. 25-35, 1979.

MCNABB, F. M. Thyroid hormones, their activation, degradation and effects on metabolism. **The Journal of nutrition**, v. 125, p. 1773S-1776S, 1995. Supplement, 6.

MEAD, J. E.; BRAUN, L.; MARTIN, D. A.; FAUSTO, N. Induction of replicative competence ("priming") in normal liver. **Cancer Research**, v. 50, p. 7023-7030, 1990.

MEAD, J. E.; FAUSTO, N. Transforming growth factor TGF α may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p. 1558-1562, 1989.

MEKEEL, K.; LANGHAM JR., M. R.; GONZALEZ-PERALTA, R. P.; HEMMING, A. W. Liver transplantation in very small infants. **Pediatric Transplantation**, v. 11, p. 66-72, 2007.

- MENDOZA L.; VIDAL-VANACLOCHA, F. Inflammatory response of tumor-activated hepatic sinusoidal endothelium as a target for the screening of metastasis chemopreventive drugs. **Methods in Molecular Medicine**, v. 85, p. 107-115, 2003.
- MENJO, M.; IKEDA, K.; NAKANISHI, M. Regulation of G1 cyclin-dependent kinases in liver regeneration. **Journal Gastroenterology Hepatology**, v. 13, p. S100-S105, 1998. Supplement.
- MEYER, D. H.; BACHEM, M. G.; GRESSNER, A. M. Modulation of hepatic lipocyte proteoglycan synthesis and proliferation by Kupffer cell-derived transforming growth factors type-beta1 and type-alpha. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 171, p. 1122-1129, 1990.
- MICHALOPOULOS, G. K. Liver regeneration. **Journal Cell Physiology**, v. 213, p. 286-300, 2007.
- MICHALOPOULOS, G. K.; BARUA, L.; BOWEN, W. C. Transdifferentiation of rat hepatocytes into biliary cells after bile duct ligation and toxic biliary injury. **Hepatology**, v. 41, p. 535-544, 2005.
- MICHALOPOULOS, G. K.; DEFRANCES, M. C. Liver regeneration. **Science**, v. 276, p. 60-66, 1997.
- MICHALOPOULOS, G. K.; DEFRANCES, M. Liver regeneration. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 93, p. 101-134, 2005.
- MICHALOPOULOS, G. K.; HOUCK, K. A.; DOLAN, M. L.; LUETTEKE, N. C. Control of hepatocyte replication by two serum factors. **Cancer Research**, v. 44, p. 4414-4419, 1984.
- MICHALOPOULOS, G. K.; KHAN, Z. Liver regeneration, growth factors, and amphiregulin. **Gastroenterology**, v. 128, p. 503-506, 2005.
- MICHALOPOULOS, G. K.; ZARNEGAR, R. Hepatocyte growth factor. **Hepatology**, v. 15, p. 149-155, 1992.
- MICHALOPOULOS, G. Liver regeneration and growth factors: old puzzles and new perspectives. **Laboratory Investigation**, v. 67, p. 413-415, 1992.
- MICHALOPOULOS, G. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. **FASEB Journal**, v. 4, p. 176-187, 1990.
- MINUK, G. Y. Hepatic regeneration: if ain't broke, don't fix it. **Canadian Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 7, p. 418-424, 2003.
- MIRANDA, G. P.; GUERRA, R. R.; PARRA, O. M.; DA SILVA, J. R. M. C.; HERNANDEZ-BLASQUEZ, F. J. Proliferação celular e aporte vascular na regeneração hepática estimulada por fatores hepatotróficos após hepatectomia parcial em ratos. **13º SIICUSP**, 2005. Disponível em: <<http://www.usp.br/13osiicusp/aprovados/ficha440htm>>. Acesso em:

- MITAKA, T.; MIZUGUCHI, T.; SATO, F.; MOCHIZUKI, C.; MOCHIZUKI, Y. Growth and maturation of small hepatocytes. **Journal Gastroenterol. Hepatology**, v. 13, p. S70-S77, 1998.
- MOHR, A. J.; LEISEWITZ, A. L.; JACOBSON, L. S.; STEINER, J. M.; RUAUX, C. G.; WILLIAMS, D. A. Effect of early enteral nutrition on intestinal permeability, intestinal protein loss, and outcome in dogs with severe parvoviral enteritis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, p. 791-798, 2003.
- MOLL, R.; FRANKE, W. W.; SCHILLER, D. I.; GEIGER, B.; KREPLER, R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. **Cell**, v. 31, p. 11-24, 1982.
- MOLL, R.; MOLL, I.; WIEST, W. Changes in the pattern of cytokeratin polypeptides in epidermis and hair follicles during skin development in human fetuses. **Differentiation**, v. 23, p. 170-178, 1982.
- MOOLTEN, F. L.; OAKMAN, N. J.; BUCHER, N. L. R. Accelerated response of hepatic DNA synthesis to partial hepatectomy in rats pretreated with growth hormone or surgical stress. **Cancer Research**, v. 30, p. 2353-2357, 1970.
- MOORMAN, A. F. M.; VERMEULEN, J. L. M.; CHARLES, R. LAMERS, W. H. Localization of ammonia-metabolizing enzymes in human liver: ontogenesis of heterogeneity. **Hepatology**, v. 9, n. 3, p. 367-372, 1989.
- MULLHAUPT, B.; FEREN, A.; FODORE, E.; JONES, A. Liver expression of epidermal growth factor RNA. Rapid Increases in Immediate-early Phase of Liver Regeneration. **Journal Biology Chemistry**, v. 269, n. 31, p. 19667-19670, 1994.
- NAGASUE, N.; YUKAYA, H.; OGAWA, Y.; KOHONO, H.; NAKAMURA, T. Human liver regeneration after major hepatic resection. A study of normal liver and livers with chronic hepatitis and cirrhosis. **Annals of Surgery**, v. 206, p. 30-39, 1987.
- NAKAMURA, T.; ARAKAKI, R.; ICHIHARA, A. Interleukin-1 is a potent growth inhibitor of adult rat hepatocyte in primary culture. **Experimental Cell Research**, v. 179, p. 488-497, 1988.
- NAKAMURA, T.; SAKATA, R.; UENO, T.; SATA, M.; UENO, H. Inhibition of transforming growth factor beta prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. **Hepatology**, v. 32, n. 2, p. 247-255, 2000.
- NEDREDAL, G. I.; ELVEVOLD, K. H.; YTREBO, L. M.; OLSEN, R.; REVHAUG, A.; SMEDSRØD, B. Revhaug and B. Smedsrod, Liver sinusoidal endothelial cells represents an important blood clearance system in pigs. **Comparative hepatology**, v. 2, p. 1, 2003.
- NELSEN, C. J.; RICKHEIM, D. G.; TUCKER, M. M.; MCKENZIE, T. J.; HANSEN, L. K.; PESTELL, R.G.; ALBRECHT, J. H. Amino acids regulate hepatocyte proliferation through modulation of cyclin D1 expression. **Journal Biology Chemistry**, v. 278, p. 25853-25858, 2003.

- NI, N.; YAGER, J. D. Comitogenic effects of estrogens on DNA synthesis induced by various growth factors in cultured female rat hepatocytes. **Hepatology**, v. 19, p. 183-192, 1994.
- NISHIDA, T.; TANAKA, H.; NAKAGAWA, S.; SASANE, T.; AWATA, T.; MANABE, R. Fibronectin synthesis in by the rabbit cornea: effects of mouse epidermal growth factor and cyclic AMP analogs. **Japanese Journal of Ophthalmology**, v. 196, p. 196-202, 1984.
- NISHIDA, T.; UESHIMA, S.; KAZUO, H.; ITO, T.; SEIYAMA, A.; MATSUDA, H. Vagus nerve is involved in lack of blood reflow into sinusoids after rat hepatic ischemia. **American Journal Physiology**, v. 275, n. 5, p. H1565-H1570, 2000.
- NOMPLEGGI, D. J.; BONKOVSKY, H. L. Nutritional supplementation in chronic liver disease: An analytical review. **Hepatology**, v. 19, p. 518-533, 1994.
- NOSTRANT, T. T.; MILLER, D. L.; APPELMAN, H. D.; GUMUCIO, J. J. Acinar distribution of liver cell regeneration after selective zonal injury in the rat. **Gastroenterology**, v. 75, p. 181-186, 1978.
- OE, S.; LEMMER, E. R.; CONNER, E. A.; FACTOR, V. M.; LEVEEN, P.; LARSSON, J.; KARLSSON, S.; THORGEIRSSON, S. S. Intact signaling by transforming growth factor beta is not required for termination of liver regeneration in mice. **Hepatology**, v. 40, p. 1098-1105, 2004.
- OETTINGER-BARAK, O.; BARAK, S.; MACHTEI, E. E.; ARDEKIAN, L.; BARUCH, Y.; PELED, M. Periodontal changes in liver cirrhosis and posttransplantation patients. I: Clinical findings. **Journal of Periodontology**, v. 79, n.9, p. 1236-1240, 2001.
- OHIRA, H.; MIYATA, M.; KURODA, M.; TAKAGI, T.; TOJO, J.; OCHIAI, H.; KOKUBUN, M.; NISHIMAKI, T.; KASUKAWA, R.; OBARA, K. Interleukin-6 induces proliferation of rat hepatocytes in vivo. **Journal of Hepatology**, v. 25, n. 6, p. 941-947, 1996.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 35, p. 351-358, 1979.
- OK, E.; YILMAZ, Z.; KARAKÜCÜK, I.; AKGÜN, H.; SAHIN, H. Use of live oil based emulsions as an alternative to soybean oil based emulsions in total parenteral nutrition and their effects on liver regeneration following hepatic resection in rats. **Annals Nutrition & Metabolism**, v. 47, n. 5, p. 221-227, 2003.
- OLSEN, P. S.; BOESBY, S.; KIRKEGAARD, P.; THERKEL-SEN, K.; ALMDAL, T.; POULSEN, S. S.; NEXO, E. Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. **Hepatology**, v. 8, p. 922-926, 1988.
- OPLETA, K.; O'LOUGHLIN, E. V.; SHAFFER, E. A.; HAYDEN, J.; HOLLENBERG, M.; GALL, D. G. Effect of epidermal growth factor on growth and postnatal development of the rabbit liver. **American Journal Physiology**, v. 235, n. 5, p. G622-G626, 1987. Pt. 1.

- OPPENHEIMER, J. H.; SCHWARTZ, H. L.; SURKS, M. I. Tissue differences in the concentration of triiodothyronine nuclear binding sites in the rat: liver kidney, pituitary, heart, brain, spleen, testis. **Endocrinology**, v. 95, p. 897-903, 1974.
- OSBORN, M.; WEBER, K. Intermediate filaments: cell-type specific markers in differentiation and pathology. **Cell**, v. 31, p. 303-306, 1982.
- PAHLAVAN, P. S.; FELDMANN JR., R. E.; ZAVOS, C.; KOUNTOURAS, J. Prometheus' challenge: molecular, cellular and systemic aspects of liver regeneration. **The Journal of Surgical Research**, v. 134, n. 2, p. 238-2351, 2006.
- PALMES, D.; SPIEGEL, H. U. Animal models of liver regeneration. **Biomaterials**, v. 25, p. 1601-1611, 2004.
- PANDIELLA, A.; MASSAGNE, J. Transforming growth factor- α . **Biochemical Society Transactions**, v. 19, p. 1991-1994, 1991.
- PARRA, O. M. **Efeitos da ciclosporina-A sobre a regeneração hepática: estudo experimental**. 1988. 153 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.
- PARRA, O. M.; DE SOUZA E SILVA R. A.; DA SILVA, J. R.; HERNANDEZ-BLASQUEZ, F. J.; PEDUTO, L.; SAAD, W. A.; SAAD JUNIOR, W. A. Enhancement of liver size by stimulation of intact rat liver with exogenous hepatotrophic factors. **Revista Paulista de Medicina**, v. 113, n. 4, p. 941-947, 1995b.
- PARRA, O. M.; HERNANDEZ-BLASQUEZ, F. J.; CUNHA DA SILVA, J. R. M.; SOUSA SILVA, R. A. P.; SAAD, W. A.; SAAD JUNIOR, W. A. Behavior of collagen extracellular liver matrix during regenerative growth after partial hepatectomy or after stimulation by exogenous hepatotrophic factors. Study in rats. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 33, n. 4, p. 212-216, 1996.
- PARRA, O. M.; SAAD, W. A.; SOUSA E SILVA, R. A. P.; HERNANDEZ-BLASQUEZ, F. J.; PEDUTO, L.; FERRAZ-NETO, B. H.; SAAD JR., W. A. Stimulation of intact rat liver by exogenous hepatotrophic factors with additional growth of its mass. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 7-11, 1994.
- PARRA, O. M.; SAAD, W. A.; FERRAZ NETO, J. B. E.; FERRI S.; SILVA, R. A. P. S.; DAL COLLETO, G. M. D.; SAAD JUNIOR, W. A. Additional growth of an intact liver induced by exogenous hepatotrophic factors: a study in rats. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 7, n. 4, p. 64-68, 1992.
- PARRA, O. M.; SAAD, W. A.; SOUSA SILVA, R. A. P.; HERNANDEZ-BLASQUEZ, F. J.; RUSSELL, W. E.; BUCHER, N. L. R. Vasopressin modulates regeneration in the Brattleboro rat. **The American Journal of Physiology**, v. 245, p. G321-G324, 1983.
- PARRA, O. M.; SILVA, R. A. P. S.; SILVA, J. R. M. C.; HERNANDEZ-BLASQUEZ, F. J.; PEDUTO, L.; SAAD, W. A.; SAAD JUNIOR, W. A. Enhancement of liver size by stimulation of intact rat liver with exogenous hepatotrophic factors. **Revista Paulista de Medicina**, v. 113, n. 4, p. 941-947, 1995a.

- PEREIRA, H. M.; HERNADEZ-BLAZQUEZ, F. J.; PARRA, O. M.; COGLIATI, B.; COSTA, W. P. Quantificação do tecido colágeno em fígado com fibrose induzida em ratas (*Rattus norvegicus albinus*) tratadas com fatores hepatotróficos exógenos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 6, p. 196-217, 2003.
- PEREIRAS, C.; HORTA, C. Gravidez e tireóide. **Acta Médica Portuguesa**, v. 16, p. 329-331, 2003.
- PETERS, M.; BLINN, G.; JOSTOCK, T.; SCHIRMACHER, P.; MEYER, Z.; BUSCHENFELDE, K. H.; GALLE, S. R–J. Combined interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor accelerates murine liver regeneration. **Gastroenterology**, v. 119, n. 6, p. 1663-1671, 2000.
- PING, C.; XIAOLING, D.; JIN, Z.; JIAHONG, D.; JIMING, D.; LIN, Z.
- PLOSKER, G. L.; FOSTER, R. H. Tacrolimus: a further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. **Drugs**, v. 59, n. 2, p. 323-389, 2000.
- PONDER, K. P. Analysis of liver development, regeneration, and carcinogenesis by genetic marking studies. **FASEB Journal**, v. 10, p. 673-682, 1996.
- PUSTOVRH, M. C.; JAWERBAUM, A.; CAPOBIANCO, E.; WHITE, V.; MARTÍNEZ, N.; LÓPEZ-COSTA, J. J.; GONZÁLEZ, E. Oxidative stress promotes the increase of matrix metalloproteinases-2 and -9 activities in the feto-placental unit of diabetic rats. **Free Radical Research**, 2005 Dec;v. 39, n. 12, p. 1285-1293, 2005.
- RAMADORI, G.; ARMBRUST, T. Cytokines in the liver. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 13, n. 7, p. 777-784, 2001.
- RAMALHO, F. S.; RAMALHO, L. N. Z.; ZUCOLOTO, S.; SILVA R. O. C. Regeneração hepática: algumas definições num universo de incertezas. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 8, n. 4, p. 177-178, 1993.
- RAMALHO, S. F.; RAMALHO, L. N. Z.; ZUCOLOTO, S.; SILVA JR. O. C. Regeneração hepática. In: SILVA JR, O. C.; ZUCOLOTO, S.; JÚNIOR, A. B. **Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia**. São Paulo: Robe, 1998. cap. 21, p. 244-258.
- RARES, H. M.; WIRSHING, R.; TUCZAK, H. V.; ISELER, G. Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy. **Cell Tissue Kinet**, v. 6, p. 517-532, 1976.
- REN, C.; CARPENTER, A.; COLLETTI, L. Stem cell factor restores hepatocyte proliferation in IL-6 knockout mice following 70% hepatectomy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, p. 1407-1418, 2003.
- RICCALTON-BANKS, L., BHANDARI, R., FRY, J.; SHAKESHEFF, K. M. A simple method for the simultaneous isolation of stellate cells and hepatócito from rat liver tissue. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 248, n. 1-2, p. 97-102, 2003.

- RICHARDSON, P. D.; WITHRINGTON, P. G. Physiological regulation of the hepatic circulation. **Annual Review Physiology**, v. 44, p. 57-69, 1982.
- ROBERTS, P. R.; BLACK, K. W.; SANTAMAURO, J. T.; ZALOGA, G. P. Dietary Peptides Improve Wound Healing Following Surgery. **Nutrition**, v. 14, n. 3, p. 266-269, 1998.
- ROBERTS, R. A.; JAMES, N. H.; COSULICH, S. C. The role of protein kinase B and mitogen-activated protein kinase in epidermal growth factor and tumor necrosis factor alpha-mediated rat hepatocyte survival and apoptosis. **Hepatology**, v. 31, n. 2, p. 420-427, 2000.
- ROMBEAU, J. L.; ROLANDELLI, R. H. **Nutrição clínica: nutrição parenteral**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2004. p. 576.
- ROMERO, F. J.; BOSCH-MORELL, F.; ROMERO, M. J.; ROMERO, B.; MARIN, N.; ROMA, J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, p. 1229-1234, 1998.
- RONCO, M. T.; DEALVAREZ, M. L.; MONTI, J.; CARRILLO, M. C.; PISANI, G.; LUGANO, M. C.; CARNOVALE, C. E. Modulation of balance between apoptosis and proliferation by lipid peroxidation (LPO) during rat liver regeneration. **Molecular Medicine**, v. 8, n. 12, p. 808-817, 2002.
- ROSE-JOHN, S.; SCHELLER, J.; ELSON, G.; JONES, S. A. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 2, p. 227-236, 2006.
- ROSS, M. A.; SANDER, C. M.; KLEEB, T. B.; WATKINS, S. C.; STOLZ, D. B. Spatiotemporal expression of factor receptors during the revascularization of regenerating rat liver. **Hepatology**, v. 34, p. 1135-1148, 2001.
- ROUILLER, C. **The liver**. London: Academic Press Inc., 1964. v. 2, p. 674.
- ROUS, P.; LARIMORE, L. D. Relation of the portal blood to liver maintenance: a demonstration of liver atrophy conditional on compensation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 31, n. 5, p. 609-632, 1920a.
- ROUS, P.; LARIMORE, L. D. The biliary factor in liver lesions. **Journal of Experimental Medicine**, v. 32, n. 2, p. 249-272, 1920b.
- ROWINSKY, E. K. Targeting the molecular target of rapamycin (mTOR). **Current Opinion in Oncology**, v. 16, n. 6, p. 564-575, 2004. Review.
- RUDOLPH, K. L.; TRAUTWEIN, C.; KUBICKA, S.; RAKEMANN, T.; BAHR, M. J.; SEDLACZEK, N.; SCHUPPAN, D.; MANNS, M. P. Differential regulation of extracellular matrix synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. **Hepatology**, v. 30, n. 5, p. 1159-1166, 1999.
- RUSSEL, W. E.; COFFEY JR., R. J.; QUELLETTE, A. J.; MOSES, H. L. Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial

hepatectomy in the rat. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 14, p. 5126-5130, 1988.

RUSSELL, W. E.; DEMPSEY, P. J.; SITARIC, S.; PECK, A. J.; COFFEY JR., R. J. Transforming growth factor alpha (TGF alpha) concentrations increase in regenerating rat liver: Evidence for a delayed accumulation of mature TGF alpha. **Endocrinology**, v. 133, p. 1731-1738, 1993.

RUSSELL, W. E.; KAUFMANN, W. K.; SITARIC, S.; LUETTEKE, N. C.; LEE, D. C. Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor-alpha targeted mice. **Molecular Carcinogenesis**, v. 15, p. 183-189, 1996.

SAAD, W. A. **Observações morfológicas autoradiográficas, histoquímicas, e bioquímicas sobre a regeneração do fígado cirrótico de rato, induzida pela hepatectomia parcial**. 1972. 46 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1972.

SAKAMOTO, Y.; JEHN, D.; NICOLSON, M.; OHASHI, E.; HAYS, D. M. Acceleration of hepatic regeneration with prior stress and growth hormone. **The Journal of Surgical Research**, v. 27, n. 1, p. 50-56, 1979.

SANCHEZ, A. R.; SHERIDAN, P. J.; ROGERS, R.S. Successful treatment of oral lichen planus-like chronic graft-versus-host disease with topical tacrolimus: a case report. **Journal of Periodontology**, v. 75, n. 4, p. 613-619, 2004.

SANTOS, N. C.; COELHO, J. F.; SILVA, J. M.; SALDANHA, C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. **Biochemical pharmacology**, v. 65, n. 7, p. 1035-1041, 2003.

SATO, A.; HIGASHI, T.; LING, L.; SHIOTA, T.; TSUJI, T. Rat liver nodules induced by 2-acetylaminofluorene lose an ability to take up indocyanine green in the process of hepatocarcinogenesis. **Acta Medica Okayama**, v. 46, n. 2, p. 57-66, 1992.

SATO, Y.; TSUKADA, K.; TANAKA, K.; HATAKEYAMA, K. New aspects in the liver regeneration following partial hepatectomy. **Nippon Geka Gakkai Zasshi**, v. 98, p. 706-712, 1997.

SCHEVING, L. A.; STEVENSON, M. C.; TAYLORMOORE, J. M.; TRAXLER, P.; RUSSELL, W. E. Integral role of the EGF receptor in HGF-mediated hepatocyte proliferation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, n. 1, p. 197-203, 2002.

SCHIBLER, U. Circadian rhythms. Liver regeneration clocks on. **Science**, v. 302, p. 234-235, 2003.

SCHIRMACHER, P.; GEERTS, A.; JUNG, W.; PIETRANGELO, A.; ROGLER, C. E.; DIENES, H. P. The role of Ito cells in the biosynthesis of HGF-SF in the liver. **EXS**, v. 65, p. 285-299, 1993.

SCHIRMACHER, P.; GEERTS, A.; PIETRANGELO, A.; DIENES, H. P.; ROGLER, C. E. Hepatocyte growth factor/hepatopietin A is expressed in fat-storing cells from rat

liver but not myofibroblast-like cells derived from fat-storing cells. **Hepatology**, v. 15, n. 1, p. 5-11, 1992.

SCHUETZ, E. G.; STROM, S.; YASUDA, K.; LECUREUR, V.; ASSEM, M.; BRIMER, C.; LAMBA, J.; KIM, R. B.; RAMACHANDRAN, V.; KOMOROSKI, B. J.; VENKATARAMANAN, R.; CAI, H.; SINAL, C. J.; GONZALEZ, F. J.; SCHUETZ, J. D. Disrupted bile acid homeostasis reveals an unexpected interaction among nuclear hormone receptors, transporters, and cytochrome P450. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 39411–39413, 2001.

SCHULTE-HERMANN, R.; GRASL-KRAUPP, B. W. Apoptosis and hepatocarcinogenesis. In: JIRTLE, R. L. (Ed.). **Liver regeneration and carcinogenesis. Molecular and cellular mechanisms**. San Diego: Academic Press, 1995. p. 141-178.

SCOTTÉ, M.; MASSON, S.; LYOUMI, S.; HIRON, M.; TÉNIÈRE, P.; LEBRETON, J. P.; DAVEAU, M. Cytokine gene expression in liver following minor or major hepatectomy in rat. **Cytokine**, v. 9, n. 11, p. 859-867, 1997.

SERANDOUR, A. L.; LOYER, P.; GARNIER, D.; COURSELAUD, B.; THERET, N.; GLAISE, D.; GUGUEN-GUILLOUZO, C.; CORLU, A. (2005) TNFalpha-mediated extracellular matrix remodeling is required for multiple division cycles in rat hepatocytes. **Hepatology**, v. 41, p. 478–486, 2005.

SHAH, K. D.; GERBER, M. A. Development of intrahepatic bile ducts in humans Immunohisto chemical study using monoclonal cytokeratin antibodies. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 113, n. 11, p. 1135-1138, 1989.

SHAPIRO, H. M. **Practical flow cytometry**. New York: Alan R. Liss, Inc., 1985.

SHELTON, M. D.; MIEYAL, J. J. Regulation by reversible S-glutathionylation: molecular targets implicated in inflammatory diseases. **Molecules and Cells**, v. 25, n. 3, p. 332-346, 2008.

SHERLOCK, S.; DOOLEY, J. **Diseases of the liver and biliary system**. Oxford: Blackwell Science, 1997.

SHI, Y. E.; YAGER, J. D. Effects of the liver tumor promoter ethinyl estradiol growth factor-induced DNA synthesis and epidermal growth factor receptor levels in cultured rat hepatócito. **Cancer Research**, v. 49, p. 3574-3580, 1989.

SHINOHARA, H.; TANAKA, A.; KITAI, T.; YANABU, N.; INOMOTO, T.; SATOH, S.; HATANO, E.; YAMAOKA, Y.; HIRAO, K. Direct measurement of hepatic indocyanine green clearance with near-infrared spectroscopy: separate evaluation of uptake and removal. **Hepatology**, v. 23, n. 1, p. 137-144, 1996.

SHINOZUKA, H.; LOMBARDI, B.; SELL, S.; IAMMARINO, R. M. Early histological and functional alterations of ethionine liver carcinogenesis in rats fed a choline-deficient diet. **Cancer Research**, v. 38, p.1092-1098, 1978.

SHORT, J.; BROWN, R. F.; HUSAKOVA, A.; GILBERTSON, J. R.; ZEMEL, R.; LIEBERMAN, I. Induction of desoxyribonucleic acid synthesis in the liver of the intact animal. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 1757-1766, 1972.

SIMPSON, G. E. C.; FINCKH, E. S. Pattern of regeneration of rat liver after repeated partial hepatectomies. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 86, p. 361-370, 1963.

SKOV OLSEN, P.; BOESBY, S.; KIRKEGAARD, P.; THERKELSEN, K.; ALMDAL, T.; POULSEN, S. S.; NEXO, E. Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. **Hepatology**, v. 8, n. 5, p. 992-996, 1988.

SKULLMAN, S.; WIRÉN, M.; GARLICK, P. J.; MCNURLAN, M. A.; LARSSON, J. Protein synthesis in regenerating rat liver during malnutrition. **Journal of Hepatology**, v. 21, n. 2, p. 174-181, 1994.

SKULLMMAN, S.; IHSE, I.; LARSSON, J. Influence of malnutrition on regeneration and composition of the liver in rat. **Acta chirurgica Scandinavica**, v. 156, p. 717-722, 1990.

SMACK, D. P.; KORGE, B. P.; JAMES, W. D. Keratin and keratinization. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 30, p. 85-102, 1994.

SMITH, C. M.; DAVIES, D. B.; MCBRIDE, M. A. Liver transplantation in the United States: a report from the Organ Procurement and Transplantation Network. **Clinical Transplants**, Abstract. p. 19-30, 2000.

SMITTH, J. W. SMITH, A.; TUDOR EVANS, B. C.; JAMES, W. S. Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 1, p. 45-60, 2002.

SPAGNOLI, F. M.; AMICONE, L.; TRIPODI, M.; WEISS, M. C. Identification of a bipotential precursor cell in hepatic cell lines derived from transgenic mice expressing cyto-Met in the liver. **Journal Cell Biology**, v. 143, n. 4, p. 1101-1112, 1998.

SPORN, M. B.; ROBERTS, A. B. Transforming growth factor b: new chemical forms and new biological roles. **Biofactors**, v. 1, p. 89-93, 1988.

ST. HILAIRE R. J.; JONES, A. L. Epidermal growth factor: its biological and metabolic effects with emphasis on the hepatocyte. **Hepatology**, v. 2, p. 601-611, 1982.

STAAL, A.; STAAL, A.; BIRKENHÄGER, J. C.; POLS, H. A.; BUURMAN, C. J.; VINK-VAN WIJNGAARDEN, T.; KLEINEKOORT, W. M.; VAN DEN BEMD, G. J.; VAN LEEUWEN, J. P. Transforming growth factor beta-induced dissociation between vitamin D receptor level and 1,25-dihydroxyvitamin D3 action in osteoblast-like cells. **Bone and Mineral**, v. 26, n. 1, p. 27-42, 1994.

STAAL, F. J.; ROEDERER, M.; HERZENBERG, L. A.; HERZENBERG, L. A. Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor kappa B and transcription of

human immunodeficiency virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 24, p. 9943-9947, 1990.

STARZL, T. E.; FRANCAVILLA, A.; PORTER, K. A.; BENICHO, J.; JONES, A. F. The effect of splanchnic viscera removal upon canine liver regeneration. **Surgery, Gynecology & Obstetrics**, v. 147, p. 193-207, 1978.

STARZL, T. E.; PORTER, K. A.; FRANCAVILLA, J. A.; BENICHO, J.; PUTNAM, C. W. A hundred years of the hepatotropic controversy. **Ciba Foundation Symposium**, v. 55, p. 111-129, 1977.

STERNHEIMER, R. The effect of a single injection of thyroxine on carbohydrates, protein and growth in the rat liver. **Endocrinology**, v. 25, p. 899-908, 1939.

STEVENS, A.; LOWE, J. S. **Histologia humana**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2001. p. 408.

STOCK, A.; SIES, H.; STAHL, W. Enhancement of gap junctional communication and connexin43 expression by thyroid hormones. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, n. 4, p. 475-479, 1998.

STOCKER, E.; PFEIFER, U. On the manner of proliferation of the liver parenchyma after partial hepatectomy. Autoradiography studies using ³H-thymidine. **Naturwissenschaften**, v. 52, p. 663, 1965.

STOSIEK, P.; KASPER, M.; KARSTEN, U. Expression of cytokeratin 19 during human liver organogenesis. **Liver**, v. 10, p. 59-63, 1990.

STREY, C. W.; MARKIEWSKI, M.; MASTELLOS, D.; TUDORAN, R.; SPRUCE, L. A.; GREENBAUM, L. E.; LAMBRIS, J. D. The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. **Journal Experimental Medicine**, v. 198, n. 6, p. 913-923, 2003.

STRICK-MARCHAND, H.; MOROSAN, S.; CHARNEAU, P.; KREMSDORF, D.; WEISS, M. C. **Bipotential mouse embryonic liver stem cell lines contribute to liver regeneration and differentiate as bile ducts and Hepatocytes**. New York: The Rockefeller University, 2004.

SU, R. J.; ZHANG, X. B.; LI, K.; YANG, M.; LI, C. K.; FOK, T. F.; JAMES, A. E.; PONG, H.; YUEN, P. M. Platelet-derived growth factor promotes ex vivo expansion of CD34+ cells from human cord blood and enhances long-term culture-initiating cells, non-obese diabetic/severe combined immunodeficient repopulating cells and formation of adherent cells. **British Journal Haematology**, v. 117, n. 3, p. 735-746, 2002.

SUN, R.; JARUGA, B.; KULKARNI, S.; SUN, H.; GAO, B. IL-6 modulates hepatocyte proliferation via induction of HGF/p21cip1: regulation by SOCS3. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 30, p. 1943-1949, 2005.

SUN, T-T, EICHNER, R.; NELSON, W. G.; SCHEFFER, C. G. T.; WEISS, R.; JARVINEN, M.; WOODCOCK-MITCHELL, J. Keratin classes: molecular markers for

different types of epithelial differentiation. **Journal Investigative Dermatology**, v. 81, p. 1095-1158, 1983.

SUZUKE, A.; IWAMA, A.; MIYASHITA, H.; NAKAUCHI, H.; TANIGUCHI, H. Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. **Development**, v. 130, p. 2513-2524, 2003.

SUZUKI, S.; NAKAMURA, S.; SAKAGUCHI, T.; OCHIAI, H.; KONNO, H.; BABA, S.; BABA, S. Alteration of reticuloendothelial phagocytic function and tumor necrosis factor-alpha production after total hepatic ischemia. **Transplantation**, v. 64, n. 6, p. 821-827, 1997.

SVANAS, G. W.; EAGON, P. K.; ELM, M.; MAKOWKA, L.; PODESTA, L.; CHAPCHAP, P.; KAHN, D.; STARZL, T. E.; VAN, THIEL, D. H. Effect of antiandrogen flutamide on measures of hepatic regeneration in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 34, p. 1916-1923, 1989.

TAKUSHI, Y.; SHIRAISHI, M.; NOZATO, E.; TOYODA, A.; NISHIMAKI, T. Expression of anti-apoptotic protein, bcl-2, in liver regeneration after a partial hepatectomy. **Journal of Surgical Research**, v. 134, p. 93-101, 2006.

TALARMIN, H.; RESCAN, C.; CARIOU, S.; GLAISE, D.; ZANNINELLI, G.; BILODEAU, M.; LOYER, P.; GUGUEN-GUILLOUZO, C.; BAFFET, G. The mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G(1) phase progression in proliferating hepatocytes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 9, p. 6003-6011, 1999.

TAMURA, F.; MASUHARA, A.; SAKAIDA, I.; FUKUMOTO, E.; NAKAMURA, T.; OKITA, K. FK506 promotes liver regeneration by suppressing natural killer cell activity. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, n. 7, p. 703-708, 1998.

TANG, X. F.; ZHOU, D. Y.; XU, Z. M.; ZHOU, X. D. Establishment and growth regulation of rat hepatocyte colony in vitro. **Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao**, v. 23, n. 2, p. 106-109, 2003.

TANNURI, A. C. A. **Modelos de regeneração hepática em animais em crescimento: estudos histológicos, moleculares e avaliação de efeitos de imunossupressores**. 2007. 99 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

TANNURI, A. C. A.; TANNURI, U. Regeneração hepática em organismos em crescimento e efeitos de drogas imunossupressoras. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 23, n. 1, p. 66-71, 2008.

TANNURI, A. C. A.; TANNURI, U.; COELHO, M. C. M.; MELLO, E. S.; SANTOS, N. A. S. R. dos. Experimental models of hepatectomy and liver regeneration utilizing newborn and weaning rats. **Clinics**, v. 62, n. 6, p. 757-762, 2007.

TANNURI, A. C. A.; TANNURI, U.; MELLO, E. S.; WAKAMATSU, A.; COELHO, M. C. M.; SANTOS, N. A. S. R. dos. Effect of the immunosuppressants on hepatocyte

- proliferation and apoptosis in a young animal model of liver regeneration. An immunohistochemical study using tissue microarray. **Pediatric Transplantation**, v. 12, p. 42-46, 2008a.
- TANNURI, U.; TANNURI, A. C. A.; COELHO, M. C. M.; MELLO, E. S.; SANTOS, N. A. S. R. dos. Effect of the immunosuppressants on hepatocyte cells proliferation and apoptosis during liver regeneration after hepatectomy – molecular studies. **Pediatric Transplantation**, v. 12, n. 1, p. 73-79, 2008b.
- TATAR, M.; BARTKE, A.; ANTEBI, A. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. **Science**, v. 299, p. 1346-1351, 2003.
- TAUB, R. A. Hepatology. In: ZAKIM, D.; BOYER, T. D. **A textbook of liver disease**. 4. ed. Philadelphia: Saunders Company, 1996. v. 2, p. 31-48, 2002.
- TAUB, R. Liver regeneration 4: transcriptional control of liver regeneration. **Faseb Journal**, v. 10, p. 413-427, 1996.
- TAUB, R. Liver regeneration: from myth to mechanism. **Nature reviews. Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 836-847, 2004.
- TAYLOR, A. L.; WATSON, C. J. E.; BRADLEY, J. A. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: mechanisms of action and therapeutic efficacy. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 56, n. 1, p. 23-46, 2005.
- THEISE, N. D.; SAXENA, R.; PORTMANN, B. C.; THUNG, S. N.; YEE, H.; CHIRIBOGA, L.; KUMAR, A.; CRAWFORD, J. M. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. **Hepatology**, v. 30, p. 1425-1433, 1999.
- THORESEN, H.; GUREN, T.; CHRISTOFFERSEN, T. Role of ERK, p38 and PI3-kinase in EGF receptor-mediated mitogenic signalling in cultured rat hepatocytes: requirement for sustained ERK activation. **Cellular Physiology Biochemistry**, v. 13, p. 229-238, 2003.
- THURMAN, R. G.; KAUFFMAN, F. C. Sublobular compartmentation of pharmacologic events (SCOPE): metabolic fluxes in periportal and pericentral regions of the liver lobule. **Hepatology**, v. 5, p. 144–151, 1985.
- TIAO, G. M.; ALONSO, M.; BEZERRA, J.; YAZIGI, N.; HEUBI, J.; BALISTRERI, W.; BUCUVALAS, J.; RYCKMAN, F. Liver transplantation in children younger than 1 year-the Cincinnati experience. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 40, n. p. 268-273, 2005.
- TOTH, C. A.; THOMAS, P. Liver endocytosis and Kupffer cells. **Hepatology**, v. 16, n. 1, p. 255-266, 1992.
- TREJO-SOLÍS, C.; SÁNCHEZ, V. C.; ARANDA-FRAUSTRO, A.; SÁNCHEZ-SEVILLA, L.; GÓMEZ-RUIZ, C.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, R. Inhibitory effect of vitamin E administration on the progression of liver regeneration induced by partial hepatectomy in rats. **Laboratory Investigation**, v. 83, n. 11, p. 1669-1679, 2003.

- UNTERMANN, T. G.; PHILLIPS, L. S. Circulating somatomedin activity during hepatic regeneration. **Endocrinology**, v. 119, p. 185-192, 1986.
- URAKAWA, T.; AZUMI, Y.; NAGAHATA, Y.; MATSUI, S.; NAKAMOTO, M.; TAKEDA, K.; ITOH, A.; ICHIHARA, T.; MORITOMO, H.; KURODA, H.; SAITOH, Y. Study of 16,16-dimethyl prostaglandin E2 for prevention of stress ulcer after hepatectomy of experimental cirrhotic liver and its influence on hepatic regeneration. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 25, p. 647-655, 1990.
- VAN BERESTEIJN, E. C. H.; KOREVAAR, J. C.; HUIJBREGTS, P. C. W.; SCHOUTEN, E. G.; BUREMA, J.; KOK, F. J. Perimenopausal increase in serum cholesterol: a 10-year longitudinal study. **American Journal of Epidemiology**, v. 137, p. 383-392, 1993.
- VAN BERKEL, T. J. C. Functions of hepatic non-perenchymal cells. In: SIES, H. (Ed.). **Metabolic compartmentation**. London: Academic Press, 1981. p. 437-482.
- VAN THIEL, D. H.; GAVALER, J. S.; KAM, L.; FRANCAVILLA, A.; POLIMENO, L.; SCHADE, R. R.; SMITH, J.; DIVEN, W.; PENKROT, R. J.; STARZL, T. E. Rapid growth of an intact human liver transplanted into a recipient larger than the donor. **Gastroenterology**, v. 93, p. 1414-1419, 1987.
- VELÁSQUEZ, L. F. U. Ritmo circadiano de triiodotironina (T3) e Tiroxina (T4) plasmática em ovelhas Ideal durante o anestro estacional. **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, v. 26, n. 3, p. 508-513, 1997.
- VELAZQUEZ, E.; MONTES, A.; RUIZ-ALBUSAC, J. M. Free cholesterol transfer from human lower-density lipoproteins (d less than 1.063) to lipoprotein-deficient serum and high-density lipoproteins. **Metabolism**, v. 39, n. 12, p. 1263-1266, 1990.
- VELLOSO, L. A. O controle hipotalâmico da fome e da termogênese: implicações no desenvolvimento da obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 165-176, 2006.
- VOEHRINGER, D. W. BCL-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 9-10, p. 945-950, 1999. Review.
- VOLAREVIC, S.; STEWART, M. J.; LEDERMANN, B.; ZILBERMAN, F.; TERRACCIANO, L.; MONTINI, E.; GROMPE, M.; KOZMA, S. C.; THOMAS, G. Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. **Science**, v. 288, p. 2045-2047, 2000.
- WALLENIS, V.; WALLENIS, K.; HISAOKA, M.; SANDSTEDT, J.; OHLSSON, C.; KOPF, M.; JANSSON, J. O. Retarded liver growth in interleukin-6-deficient and tumor necrosis factor receptor-1-deficient mice. **Endocrinology**, v. 142, p. 2953-2960, 2001.
- WANG, X.; FOSTER, M.; AL-DHALIMY, M.; LAGASSE, E.; FINEGOLD, M.; GROMPE, M. The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 11881-11888, 2003. Supplement, 1.

- WANG, X.; KIYOKAWA, H.; DENNEWITZ, M. B.; COSTA, R. H. The Forkhead Boxm1b transcription factor is essential for hepatocyte DNA replication and mitosis during mouse liver regeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 16881-16886, 2002.
- WANG, Y. J.; WU, J. C.; LEE, S. D.; TASAI, Y. T.; LO, K. J. Gonadal dysfunction and changes in sex hormones in post necrotic cirrhotic men: a matched study with alcoholic cirrhotic men. **Hepatogastroenterology**, v. 38, p. 531-534, 1991.
- WEGLARZ, T. C.; SANDGREN, E. P. Timing of hepatocyte entry into DNA synthesis after partial hepatectomy is cell autonomous. **National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 12595-12600, 2000
- WHEELER, H. O.; CRANSTON, W. I.; MELTZER, J. I. Hepatic uptake and biliary excretion of indocyanine green in the dog. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 99, n. 1, p. 11-14, 1958.
- WILKERSON, M. J. Principles of flow cytometry and cell sorting. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN COLLEGE OF VETERINARY PATHOLOGISTS. (ACVP), 55.; ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL PATHOLOGY. (ASVCP), 39., 2004, Orlando, Florida. **Abstracts...** 2004.
- WILKERSON, M. J.; DAVIS, E.; SHUMAN, W.; HARKIN, K. Isotype specific antibodies in horses and dogs with immune mediated hemolytic anemia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v.14, n. 2, p.190-196, 2000.
- WILKERSON, M. J.; WILMA SHUMAN, W.; SHANNON SWIST, S.; KENNETH HARKIN, K.; JAMES MEINKOTH, J. Platelet surface associated IgG and reticulated platelets in dogs with thrombocytopenia. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 30, n. 3, p.141-149, 2001.
- WINAU, F.; HEGASY, G.; WEISKIRCHEN, R.; WEBER, S.; CASSAN, C.; SIELING, P. A.; MODLIN, R. L.; LIBLAU, R. S.; GRESSNER, A. M.; KAUFMANN, S. H. Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. **Immunity**, v. 26, p. 117-129, 2007.
- WISSE, E. An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 31, p. 125-150, 1970.
- WOODWARD, T. L.; XIE, J. W.; HASLAM, S. Z. The role of mammary stroma in modulating the proliferative response to ovarian hormones in the normal mammary gland, **Journal Mammary Gland Biology Neoplasia**, v. 3, n. 2. p. 117-131,1998.
- WRIGHT, N.; ALISON, M. The liver. In: WRIGHT, N.; ALISON, M. (Ed.). **The biology of epithelial cell population**. Oxford: Clarendon Press, 1984. v. 2. p. 890-908.
- WUESTEFELD, T.; KLEIN, C.; STREETZ, K. L.; BETZ, U.; LAUBER, J.; BUER, J.; MANNS, M. P.; MÜLLER, W.; TRAUTWEIN, C. Interleukin- 6/glycoprotein 130-dependent pathways are protective during liver regeneration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 11281-11288, 2003.

XU, B.; BROOME, U.; UZUNEL, M.; NAVA, S.; GE, X.; KUMAGAI-BRAESCH, M.; HULTENBY, K.; CHRISTENSSON, B.; ERICZON, B. G.; HOLGERSSON, J.; SUMITRAN-HOLGERSSON, S. Capillarization of hepatic sinusoid by liver endothelial cell-reactive autoantibodies in patients with cirrhosis and chronic hepatitis. **American Journal Pathology**, v. 163, n. 4, p. 1275-1289, 2003.

YAMADA, T.; YOSHIKAWA, M.; KANDA, S.; KATO, Y.; NAKAJIMA, Y.; ISHIZAKA, S.; TSUNODA, YUKIO. In Vitro Differentiation of Embryonic Stem Cells into Hepatocyte-Like Cells Identified by Cellular Uptake of Indocyanine Green. **Stem Cells**, v. 20, n. 2, p. 146-154, 2002.

YAMAGUCHI, T.; MINOR, T.; ISSELHARD, W. Effect of glutamine or glucagon-insulin enriched total parenteral nutrition on liver and gut in 70% hepatectomized rats. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 185, p. 156-162, 1997.

YAMAMOTO, T.; HIROHASHI, K.; TANAKA, H.; UENISHI, T.; SHUTO, T.; KUBO, S.; KINOSHITA, H. **Resectable pleomorphic giant cell carcinoma of the pancreas**. *International Journal of Pancreatology*, v. 29, n. 1, p. 63-67, 2001.

YOSHINO, R.; MIURA, K.; SEGAWA, D.; HIRAI, Y.; GOTO, T.; OHSHIMA, S.; MIKAMI, K.; YONEYAMA, K.; SHIBUYA, T.; WATANABE, D.; KATAOKA, E.; TAKEUCHI, S.; ENDOH, A.; SATO, W.; WATANABE, S. Epimorphin expression and stellate cell status in mouse liver injury. **Hepatology Research**, v. 34, n. 4, p. 238-249, 2006.

YU, W.; DAHL, G.; WERNER, R. The connexin43 gene is responsive to oestrogen. **Proceedings Biological Sciences**, v. 255, n. 1343, p. 125-132, 1994.

ZAJICEK, G.; OREN, R.; WEINREB, J. R. M. The streaming liver. **Liver**, v. 5, p. 295-300, 1985.

ZARNEGAR, R.; DEFRANCES, M. C.; KOST, D. P.; LINDROOS, P.; MICHALOPOULOS, G. K. Expression of hepatocyte growth factor mRNA in regenerating rat liver after partial hepatectomy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 177, n. 1, p. 559-565, 1991.

ZARNEGAR, R.; MICHALOPOULOS, G. K. Purification and biological characterization of human hepatopoietin A, a polypeptide growth factor for hepatócito. **Cancer Research**, v. 49, p. 3314-3320, 1989

ZHANG ZHONG-TAO; JIANG PENG; WANG YU; LI JIAN-SHE; XUE JIAN-GUO; ZHOU YAN-ZHONG; YUAN ZHU. Effects of hepatotrophic factors on the liver after portacaval shunt in rats with portal hypertension. **Chinese Medical Journal**, v. 119, n. 20, p. 1727-1733, 2006.

ZHAO, R.; DUNCAN, S. A. Embryonic development of the liver, **Hepatology**, v. 41, p. 956-967, 2005.

ZIEGLER, K. Further characterization of 3'-isothiocyanatobenzamido[3H]cholate binding to hepatocytes. Correlation with bile acid transport inhibition and protection by substrates and inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 819, n. 1, p. 37-44, 1985.

ZIMMERS, T. A.; MCKILLOP, I. H.; PIERCE, R. H.; YOO, J. Y.; KONIARIS, L. G. Massive liver growth in mice induced by systemic interleukin 6 administration. **Hepatology**, v. 38, p. 326-334, 2003.

Anexos

	D0547	D2906	D6421	D6434	D8900	D8062	D8437	D9785
	[powder]	[powder]	[1×]	[1×]	[powder]	[1×]	[1×]	[powder]
COMPONENT	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L
Vitamins								
D-Biotin	0.000035	0.000035	0.000035	0.000035	0.000035	0.000035	0.000035	0.000035
Choline Chloride	0.00898	0.00898	0.00898	0.00898	0.00898	0.00898	0.00898	0.00898
Folic Acid	0.00266	0.00266	0.00265	0.00266	0.00266	0.00266	0.00266	0.00266
<i>m yo</i> -Inositol	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126
Niacinamide	0.00202	0.00202	0.00202	0.00202	0.00202	0.00202	0.00202	0.00202
D-Pantothenic Acid · ½Ca	0.00224	0.00224	0.00224	0.00224	0.00224	0.00224	0.00224	0.00224
Pyridoxal · HCl	0.002	0.002	—	0.002	0.002	0.002	—	0.002
Pyridoxine · HCl	0.000031	0.000031	0.002031	0.002031	0.000031	0.002031	0.002031	0.000031
Riboflavin	0.000219	0.000219	0.000219	0.000219	0.000219	0.000219	0.000219	0.00219
Thiamine · HCl	0.00217	0.00217	0.00217	0.00217	0.00217	0.00217	0.00217	0.00217
Vitamin B ₁₂	0.00068	0.00068	0.00068	0.00068	0.00068	0.00068	0.00068	0.00068
Other								
D-Glucose	3.15	3.15	3.15	3.15	3.15	3.15	3.15	3.15
HEPES	—	3.5746	3.5746	3.5746	3.5746	—	3.5746	3.5746
Hypoxanthine	0.0021	0.0021	0.0021	0.0021	0.0021	0.0021	0.0021	0.0021
Linoleic Acid	0.000042	0.000042	0.000042	0.000042	0.000042	0.000042	0.000042	0.000042
Phenol Red · Na	0.00863	—	0.00863	—	0.00863	0.00863	0.00863	—
Putrescine · HCl	0.000081	0.000081	0.000081	0.000081	0.000081	0.000081	0.000081	0.000081
Pyruvic Acid · Na	0.11	0.055	0.055	0.055	0.055	0.055	0.055	0.055
DL-Thioctic Acid	0.000105	0.000105	0.000105	0.000105	0.000105	0.000105	0.000105	0.000105
Thymidine	0.000365	0.000365	0.000365	0.000365	0.000365	0.000365	0.000365	0.000365
ADD								
NaHCO ₃	1.2	1.2	—	—	1.2	—	—	1.2
CaCl ₂ · 2H ₂ O	—	—	—	—	—	—	—	0.1546
L-Glutamine	—	—	0.365	0.365	—	—	—	0.365
L-Leucine	—	—	—	—	—	—	—	0.05905
L-Lysine · HCl	—	—	—	—	—	—	—	0.09125
MgCl ₂ · 6H ₂ O	—	—	—	—	—	—	—	0.0812
MgSO ₄	—	—	—	—	—	—	—	0.04884
L-Methionine	—	—	—	—	—	—	—	0.0172

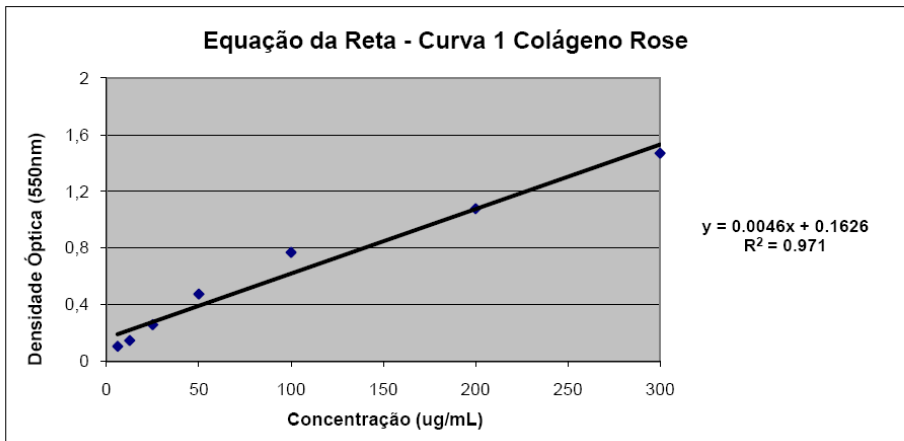
JF_LCM,MAM 10/09-1

ANEXO B - Equação da reta CURVA PADRÃO 1 e 2

Branco 1	CURVA 1					CURVA 2				
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0,053	0,105	0,102	0,102	0,111	0,105	0,129	0,132	0,132	0,125	0,1295
	0,14	0,148	0,148	0,148	0,146	0,169	0,168	0,168	0,164	0,16725
	0,255	0,251	0,255	0,269	0,2575	0,206	0,22	0,22	0,194	0,21
	0,48	0,479	0,476	0,462	0,47425	0,236	0,232	0,23	0,228	0,2315
	0,78	0,77	0,795	0,73	0,76875	0,245	0,262	0,269	0,271	0,26175
	1,119	1,088	1,061	1,043	1,07775	0,379	0,327	0,299	0,312	0,32925
	1,495	1,485	1,414	1,486	1,47	0,42	0,475	0,471	0,461	0,45675

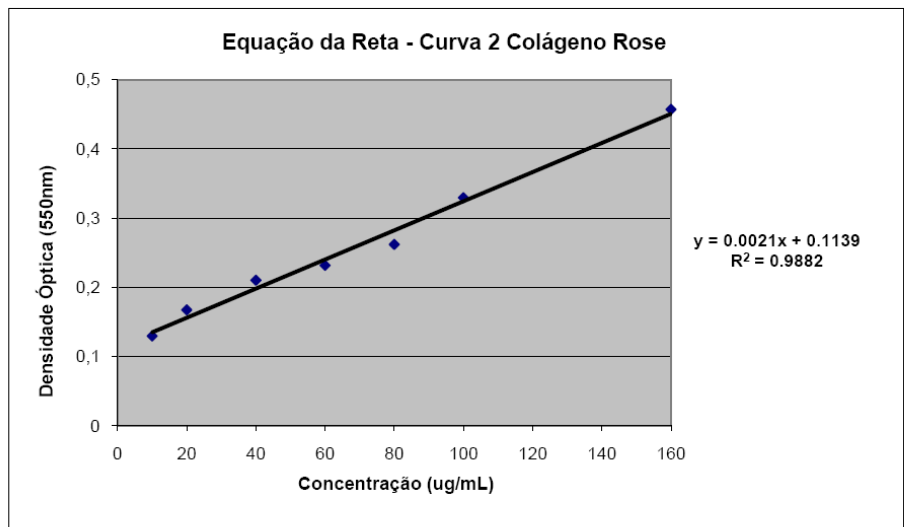
□ Médias

6	0,105
12,5	0,146
25	0,2575
50	0,47425
100	0,76875
200	1,07775
300	1,47



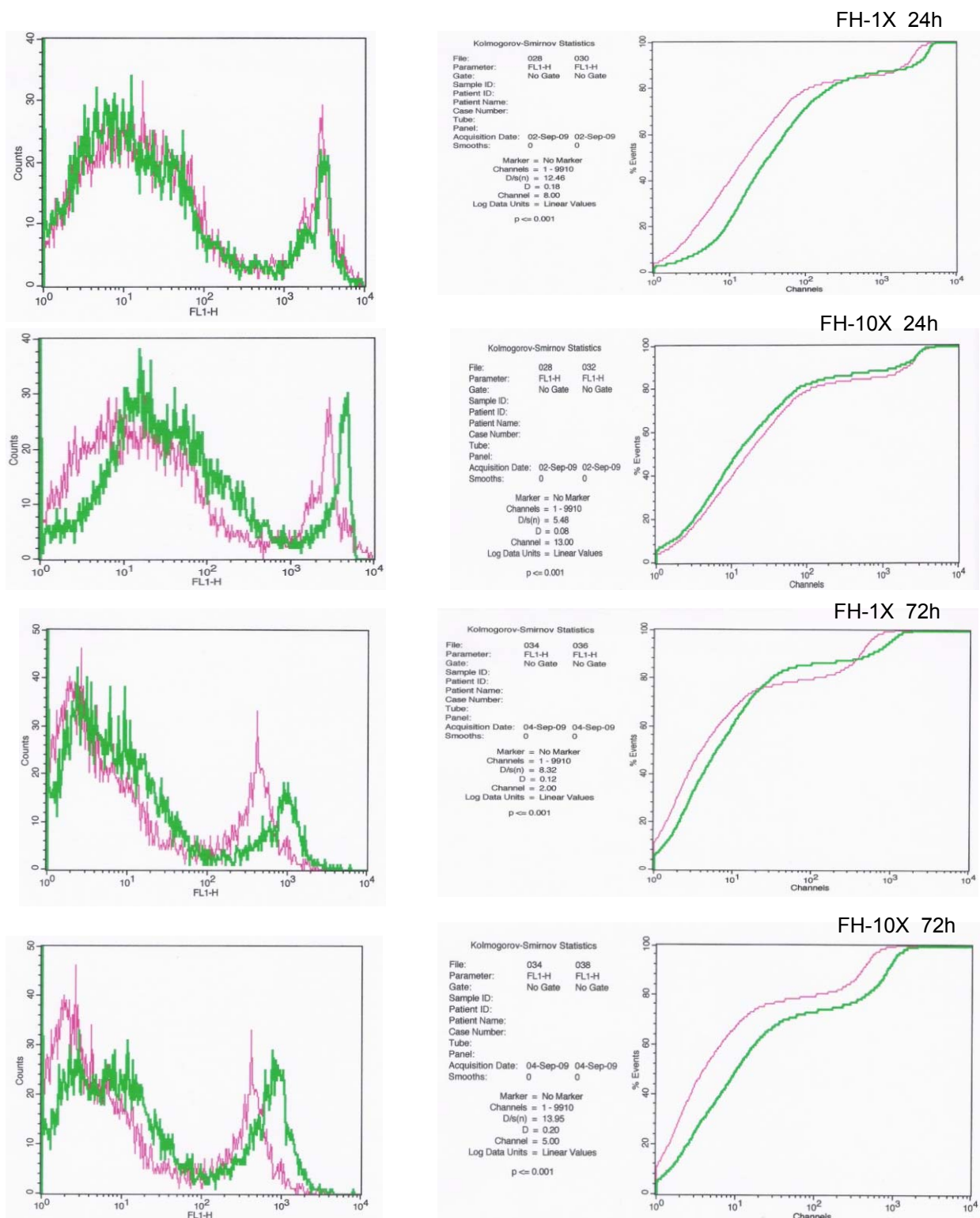
□ Médias

10	0,1295
20	0,16725
40	0,21
60	0,2315
80	0,26175
100	0,32925
160	0,45675



ANEXO C

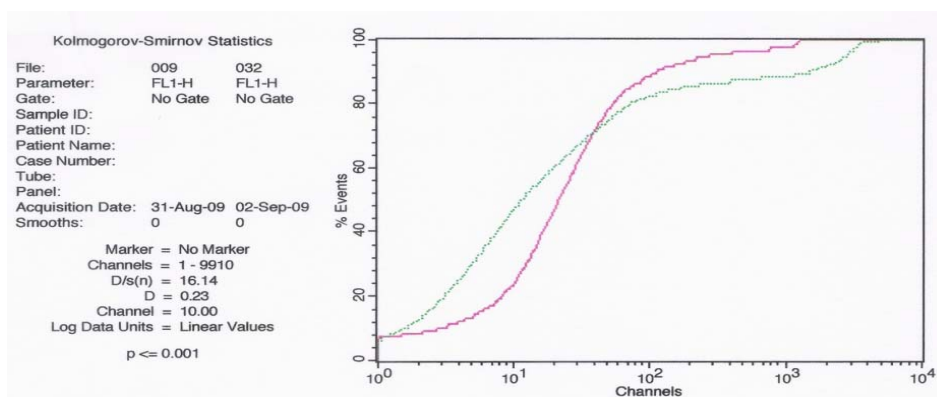
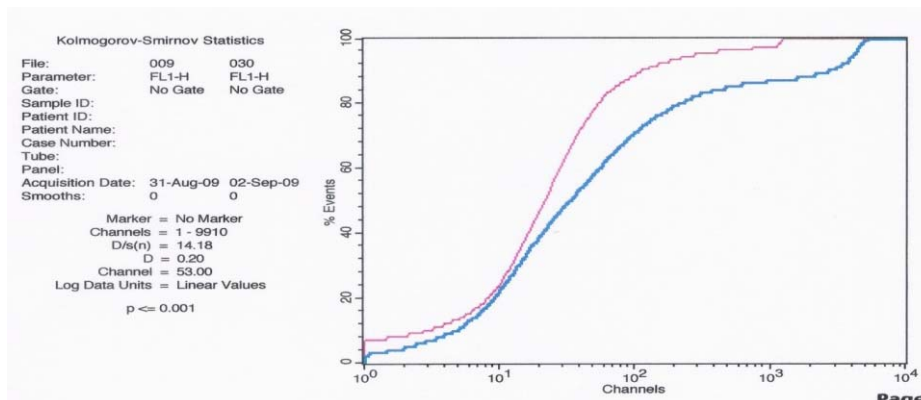
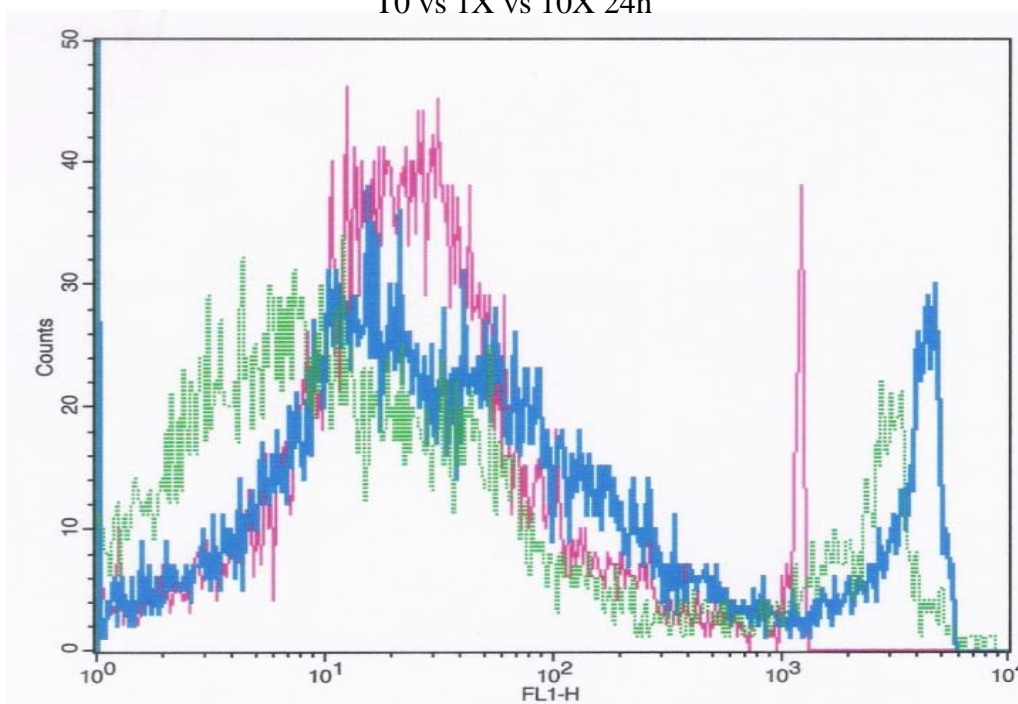
Potencial de membrana mitocondrial



Análise estatística comparativa pelo teste Kolmogorov-Smirnov dos hepatócitos do grupo controle T0 (curva rosa) e tratados com FH 1X e 10X (curva verde) durante 24 e 72 horas

Potencial de membrana mitocondrial

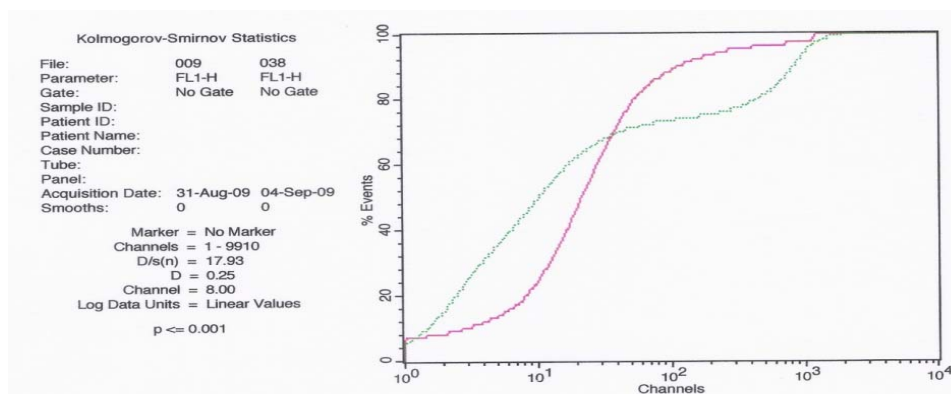
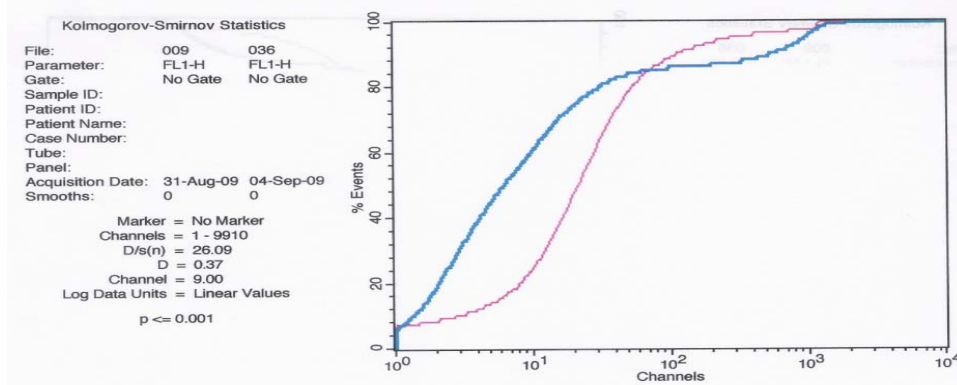
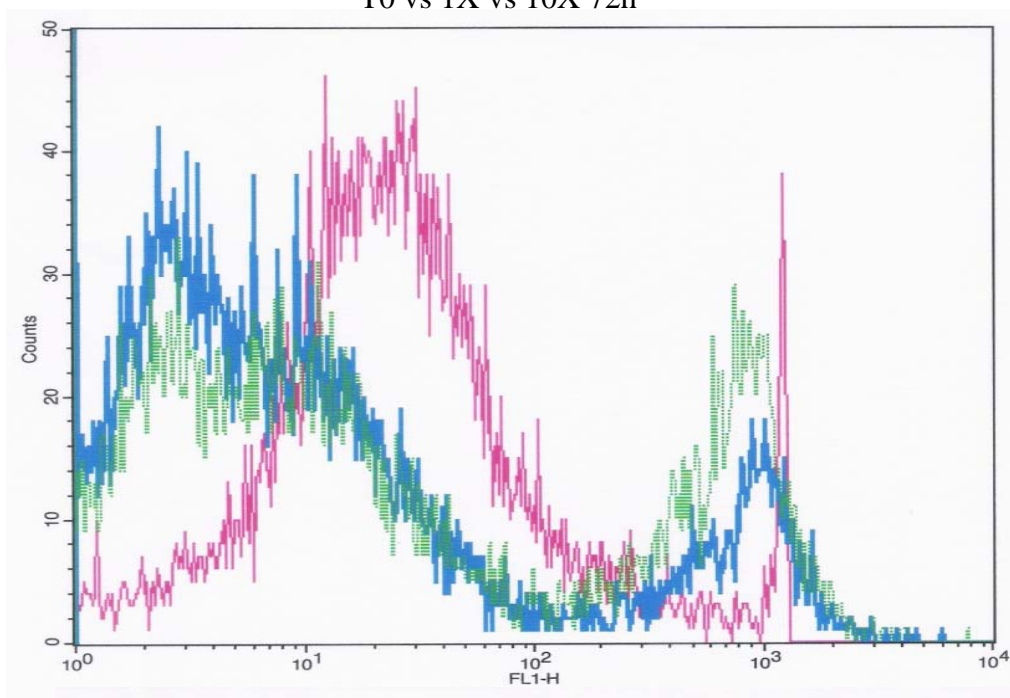
T0 vs 1X vs 10X 24h



Análise estatística comparativa pelo teste Kolmogorov-Smirnov dos hepatócitos do grupo controle T0 (curva rosa) e tratados com FH1X (curva azul) e FH10X (curva verde) durante 24 horas

Potencial de membrana mitocondrial

T0 vs 1X vs 10X 72h



Análise estatística comparativa pelo teste Kolmogorov-Smirnov dos hepatócitos do grupo controle T0 (curva rosa) e tratados com FH 1X (curva azul) e FH10X (curva verde) durante 72 horas